

Bakteriofagien käyttö eläinten bakteeri-infektioiden hoidossa

Juhani Ikonen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Kliininen diagnostiikka

2020



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliininen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author Juhani Ikonen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Bakteriofagien käyttö eläinten bakteria-infektioiden hoidossa			
Oppiaine - Läroämne – Subject Kliininen diagnostiikka			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum – Month and year Kesäkuu 2020	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 33
<p>Tiivistelmä - Referat – Abstract</p> <p>Antibiootit ovat olleet suuressa roolissa mahdollistamassa nykyisten ruoantuotantoketjujen muodostumisen. Lemmikkieläinten määrä on samaan aikaan kasvanut ja lemmikkejä hoidetaan tänä päivänä yhä enemmän antibiooteilla. Antibioottien käyttö on kuitenkin johtanut antibiooteille vastustuskykyisten bakteereiden kehittymiseen, mikä vaikeuttaa jo nyt eläinten sekä ihmisten bakteria-infektioiden hoitoa. Useat tahot tekevät työtä antibioottien vastuullisen käytön edistämiseksi ja resistenssiongelman torjumiseksi. Samalla on myös etsitty antibiooteille vaihtoehtoisia hoitomuotoja, joista bakteriofagit ovat yksi esimerkki.</p> <p>Bakteriofagit eli faagit ovat luonnossa esiintyviä, bakteereita infektoivia ja tuhoavia viruksia. Bakteriofagien monimuotoisuuden vuoksi jokaiselle bakteerille arvioidaan löytyvän sitä infektoimaan pystyvä faagi. Bakteriofagihoidolla tarkoitetaan bakteriofagien hyödyntämistä bakteria-infektioiden hoidossa tai torjunnassa. Eläinten hoitoon bakteriofageja on käytetty ensimmäisen kerran jo 1920-luvulla eli ennen antibioottien löytämistä. Penisilliini ja muut tehokkaat antibiootit veivät kuitenkin huomion pois bakteriofageista, kunnes kiinnostus bakteriofageihin jälleen heräsi antibioottiresistenssin myötä. Bakteriofagihoidon onnistumisen kannalta on olennaista ymmärtää bakteerin, bakteriofagin ja elimistön välisiä vuorovaikutuksia. Hoitoon käytettävät bakteriofagit tulee valita huolella hoidon turvallisuuden sekä tehokkuuden takaamiseksi. Yksilöllisessä bakteriofagihoidossa taudinaiheuttajabakteeri eristetään ja juuri tälle patogeenille tehokkaista bakteriofageista valmistetaan hoitotuote. Toinen mahdollisuus on käyttää ennakolta valmistettuja hoitotuotteita, joita voidaan käyttää jo ennen patogeenin eristämistä. Bakteriofagihoidon erityispiirteisiin kuuluvat spesifisyys isäntäbakteerin suhteen, synergiaedut yhdistettyinä antibiootteihin tai toisiin faageihin sekä kustannustehokkuus.</p> <p>Eläimillä bakteriofagitutkimus on painottunut tuotantoeläimiin ja lemmikkieläimiä koskevia julkaisuja on vain muutamia. Tuotantoeläimillä tutkimusta on etenkin tehty yleisistä, taloudellisesti merkittävistä tai elintarvikehygieniää vaarantavista sairauksista ja taudinaiheuttajista. Bakteriofagihoidon tehokkuus on ollut tutkimuksissa vaihtelevaa. Naudan utaretulehdus on yksi eniten tutkijoita kiinnostanut sairaus ja tältä osin bakteriofageilla ei pääsääntöisesti ole saavutettu haluttua hoitovastetta. Bakteriofageilla ei myöskään ole onnistuttu vähentämään metisilliinille resistentin <i>Staphylococcus aureus</i> -bakteerin (MRSA) määrää siassa. Sen sijaan bakteriofagien tehokkuudesta on saatu näyttöä vasikkaripulin, porsaiden vieroitusripulin ja koiran ulkokorvantulehduksen hoidossa sekä siipikarjassa zoonoottisesti merkittävien salmonella- ja kampylobakteerien torjunnassa. Myös useamman kalataudin torjunnassa bakteriofagien hyödyntämisessä on edistytty.</p> <p>Tutkimus eläinten bakteria-infektioiden hoidosta bakteriofageilla on niukkaa. Saadut tulokset ovat vaihtelevia ja osittain myös keskenään ristiriitaisia. Antibiootteja täydentäville hoitomuodoille on aitoa tarvetta, ja bakteriofagit ovat ominaisuuksiensa takia mielenkiintoinen vaihtoehto. Kirjallisuuskatsauksen perusteella bakteriofagien mahdollinen soveltuvuus eläinten bakteria-infektioiden hoitoon jää odottamaan lisätutkimuksia.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords bakteriofagi, bakteriofagihoito, bakteria-infektio, mikrobilääkeresistenssi, eläinlääketiede			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktör och ledare – Director and Supervisor(s) johtaja Marja Raekallio, ohjaaja Katarina Eskola			

Sisällys

1 JOHDANTO	1
2 BAKTERIOFAGIT	3
2.1 YLEISTÄ BAKTERIOFAGEISTA	3
2.2 RAKENNE JA LUOKITTELU	3
2.3 BAKTERIOFAGIEN ELINKIERTO.....	4
2.3.1 Lyyttiset bakteriofagit	4
2.3.2 Lysogeeniset bakteriofagit	6
2.3.3 Bakteriofagien muita elinkiertoja	6
3 BAKTERIOFAGIHOITO	8
3.1 UUSI TULEMINEN	8
3.2 BAKTERIOFAGIEN ERISTÄMINEN.....	8
3.3 BAKTERIOFAGIHOIDON TOTEUTTAMINEN	10
3.4 BAKTERIOFAGIHOIDON FARMAKOLOGIAA	11
3.5 BAKTEERIEN JA BAKTERIOFAGIEN VUOROVAIKUTUS.....	11
3.6 BAKTERIOFAGIHOIDON HYÖTYJÄ.....	13
3.7 BAKTERIOFAGIHOIDON HAASTEITA	14
4 BAKTERIOFAGIEN KÄYTTÖ ELÄINLÄÄKETIETEESSÄ	17
4.1 NAUTA.....	17
4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.1.2 <i>Escherichia coli</i>	19
4.2 SIIPIKARJA.....	20
4.2.1 <i>Salmonella spp.</i>	20
4.2.2 <i>Campylobacter jejuni</i>	22
4.3 SIKA	23
4.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
4.3.2 <i>Escherichia coli</i>	24
4.4 KALAT	25
4.4.1 Flavobakteerit	25
4.4.2 <i>Aeromonas salmonicida</i>	27
4.4.3 <i>Vibrio anguillarum</i>	28
4.5 LEMMIKKIELÄIMET.....	28
4.5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
4.5.2 <i>Escherichia coli</i>	30
5 POHDINTA	31
6 LÄHDELUETTELO	34

1 JOHDANTO

Bakteriofagit ovat hyvin laaja ja monimuotoinen ryhmä bakteereita infektoivia viruksia, joita löytyy kaikkialta missä bakteereita tavataan. Ensimmäiset havainnot bakteriofageista tehtiin yli 100 vuotta sitten ja bakteriofageja on käytetty eläinten infektioautien hoidossa 1920-luvulta lähtien. Kuitenkin penisilliinin keksiminen ja mikrobilääkkeiden tehokkuus sekä vähäinen tieto bakteriofageista lähes pysäyttivät bakteriofagien käytön ja tutkimuksen etenkin länsimaissa. Myöhemmin huoli mikrobilääkkeiden riittävydestä tulevaisuudessa on herättänyt mielenkiinnon uudelleen bakteriofageihin ja niiden hyödyntämiseen bakteri-infektioiden torjunnassa (Gelman ym. 2018).

Kestävä ruoantuotanto ja turvallisen ruoan varmistaminen ovat nykyajan suuria globaaleita haasteita (Berry ym. 2015). Mikrobilääkkeiden laajamittainen käyttö eläimillä on mahdollistanut suurelta osin nykyisenkaltaisen tehokkaan eläintenpidon, missä tiiviiden tuotantotilojen mukanaan tuomaa tautipainetta on voitu kontrolloida mikrobilääkkein. Tämä on johtanut mikrobilääkkeiden käytön lisääntymiseen eläimillä ja osaltaan myötävaikuttanut mikrobilääkeresistenttien bakteereiden kehittymiseen (Food and Agriculture Organization 2016). Maailman terveysjärjestö (WHO) ja YK:n elintarvike- ja maatalousjärjestö (FAO) ovat tehneet töitä mikrobilääkeresistenssin syntymisen ja leviämisen ehkäisemisen eteen vuosia varmistaakseen mikrobilääkkeiden tehokkuuden ihmisten ja eläinten sairauksien hoidossa myös jatkossa. Tärkeänä osana kokonaisuudessa on mikrobilääkkeiden vastuullinen käyttäminen eläimillä (WHO 2015).

Yksi herätys mikrobilääkeresistenssiin tapahtui vuonna 2016, jolloin Kiinasta löydettiin kliinisesti tärkeälle kolistiinille vastustuskykyisiä enterobakteereita (Liu ym. 2016). Uusi plasmidivälitteinen MCR-1 resistenssigeeni eristettiin ensin sialta, jonka jälkeen sitä on löydetty ihmisiltä, tuotantoeläimiltä, lemmikeiltä ja ruuasta useista eri maista (Gharaibeh ja Shatnawi 2019).

Arvioiden mukaan 75 % tuotantoeläimille käytetyistä mikrobilääkkeistä ei jää eläimeen vaan leviää eritteiden mukana ympäristöön (Chee-Sanford ym. 2009). Lisäksi mikrobilääkkeiden käyttö lisää resistenttien bakteereiden ja virulenssitekijöiden määrää eläimen suolistossa, joita lopulta päätyy myös maaperään ja ympäristöön (Chee-Sanford ym. 2009).

Lemmikkieläinten rooli on muuttunut voimakkaasti viimeisten vuosikymmenten aikana, esimerkiksi seurakoirien määrä on voimakkaasti kasvanut ja koiria pidetään nykyään yhä enemmän perheenjäsenenä (Rowan ja Kartal 2018). Samalla kiinnostus ja halu panostaa lemmikkien terveyteen ja hyvinvointiin on kasvanut. Tämä on osaltaan johtanut lisääntyneeseen mikrobilääkkeiden käyttöön ja resistenssiin myös lemmikeillä (Pomba ym. 2017). Lemmikkieläinten mikrobilääkeresistenssin erityispiirteitä ovat vaikeasti hoidettavat infektiot, ihmisten terveydelle tärkeiden mikrobilääkkeiden väärinkäyttö ja mahdollisuus lemmikkien läheisestä ihmiskontaktista johtuviin zoonoottisiin eli eläimestä ihmisiin tarttuviin infektioihin (Scott Weese 2008).

Suomen tilanne poikkeaa monesta muusta maasta eläinten mikrobilääkkeiden käytön ja resistenssin suhteen. Määrällisesti eläinten mikrobilääkkeitä käytetään Suomessa huomattavasti vähemmän kuin Euroopan unionissa keskimäärin (Ruokavirasto 2019a). Esimerkkinä mikrobilääkkeiden käyttöä vähentävistä toimintatavoista tuotantoeläimillä Suomessa suositaan yksilöiden sairauksien hoitamista ennaltaehkäisevien ryhmähoitojen sijasta (Evira 2016). Vuoden 2018 tietojen mukaan tilanne mikrobilääkeresistenssin osalta on pysynyt tuotantoeläimillä melko hyvänä Suomessa, ja lemmikkieläinten bakteereilla mikrobilääkeresistenssi on jopa vähentynyt (Ruokavirasto 2019b).

Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on kartoittaa mitä tutkimusta bakteriofagien käytöstä eläinlääketieteessä on tehty. Samalla pohditaan bakteriofagihoidon hyötyjä ja haasteita. Katsauksessa käydään läpi bakteriofagien biologiaa, bakteriofagihoidon yleisiä periaatteita sekä eri sairauksien bakteriofagitutkimusta patogeeneittain niin hyöty- kuin lemmikkieläimien osalta.

2 BAKTERIOFAGIT

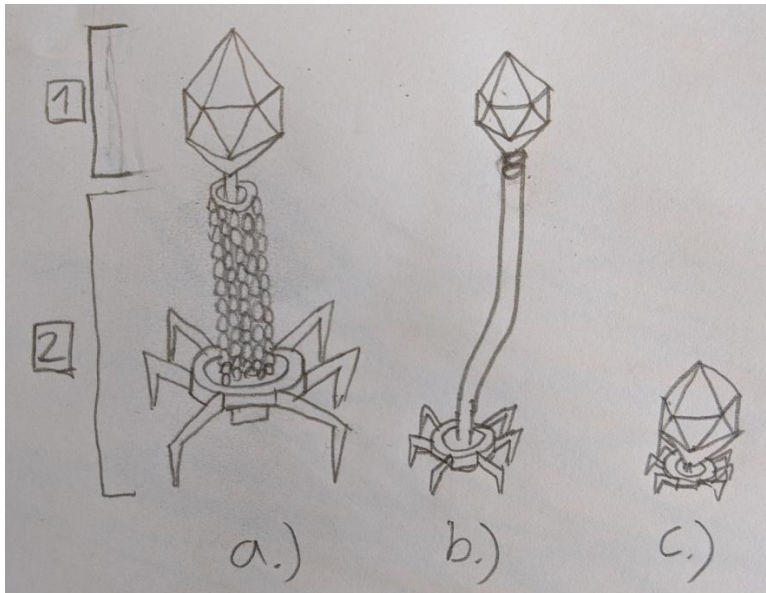
2.1 Yleistä bakteriofageista

Bakteriofagit eli faagit ovat ainoastaan prokaryoottisoluja eli bakteereita ja arkkeja infektoivia viruksia (Domingo-Calap ja Delgado-Martínez 2018). Bakteriofageja pidetään maapallon runsaslukuisimpana eliöryhmänä ja lukumäärällisesti bakteriofageja on arveltu olevan yhteensä 10^{31} – 10^{32} . Ympäristöstä löytyvästä valtavasta bakteriofagimäärästä on ennustettu löytyvän kaikille bakteereille sitä infektoimaan pystyvä bakteriofagi (Skurnik ja Kiljunen 2016). Bakteriofagien yksi suuri etu mikrobilääkkeisiin verrattuna on niiden spesifisyys. Osa bakteriofageista on erittäin isäntäspesifisiä ja voi lisääntyä vain tietyissä bakteerikannoissa. Tämä ominaisuus vaihtelee ja osa bakteriofageista käyttää isäntinään useampaa kantaa, mutta on melko harvinaista, että bakteriofagi pystyy lisääntymään useammassa eri bakteerilajissa (Skurnik ja Strauch 2006). Spesifisyyttä voidaan hyödyntää esimerkiksi enteraalisisä eli suun kautta annettavissa valmisteissa, jolloin hoito voidaan kohdentaa vain patogeeniin suoliston normaalien bakteerikantojen säästyessä (Drulis-Kawa ym. 2012). Bakteriofagit ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa bakteereiden, eläinten ja ihmisten kanssa ja kuuluvat olennaisena osana eläinten ja ihmisten normaaliin mikrobiomiin (Mirzaei ja Maurice 2017).

2.2 Rakenne ja luokittelu

Bakteriofagien genomi koostuu joko yksi- tai kaksikierteisestä DNA:sta tai RNA:sta, joka on pakkautuneena proteiinista muodostuneen kapsidin sisään (Weinbauer 2004). Kapsidia ympäröi joillakin faageilla vielä lipideistä ja proteiineista muodostuva vaippa. Kapsidin ohella *Caudovirales*-lahkon bakteriofageilla on häntä, johon voi olla liittyneenä muita rakenteita kuten kaulus, aluslevy ja hännän kuidut (Weinbauer 2004). Näiden rakenteiden merkitys liittyy bakteriofagin kiinnittymiseen bakteeriin ja viruksen genomien injektointiin (Yap ym. 2016).

96 prosenttia kaikista eristetyistä bakteriofageista on kuulunut *Caudovirales*-lahkoon (Weinbauer 2004). *Caudovirales*-lahkon bakteriofagien ikosaedriseen kapsidiin pakkautunut genomi on kaksijuosteista DNA:ta (dsDNA), ja lahkon bakteriofagit jaotellaan edelleen hännän ominaisuuksien mukaan perheisiin (Skurnik ja Kiljunen 2016).



Kuva 1. Kaavakuva *Caudovirales*-lahkon bakteriofageista. A. *Myoviridae*, b. *Siphoviridae* ja c. *Podoviridae*. 1) kapsidi, ja 2) häntä. (Kuva: Juhani Ikonen)

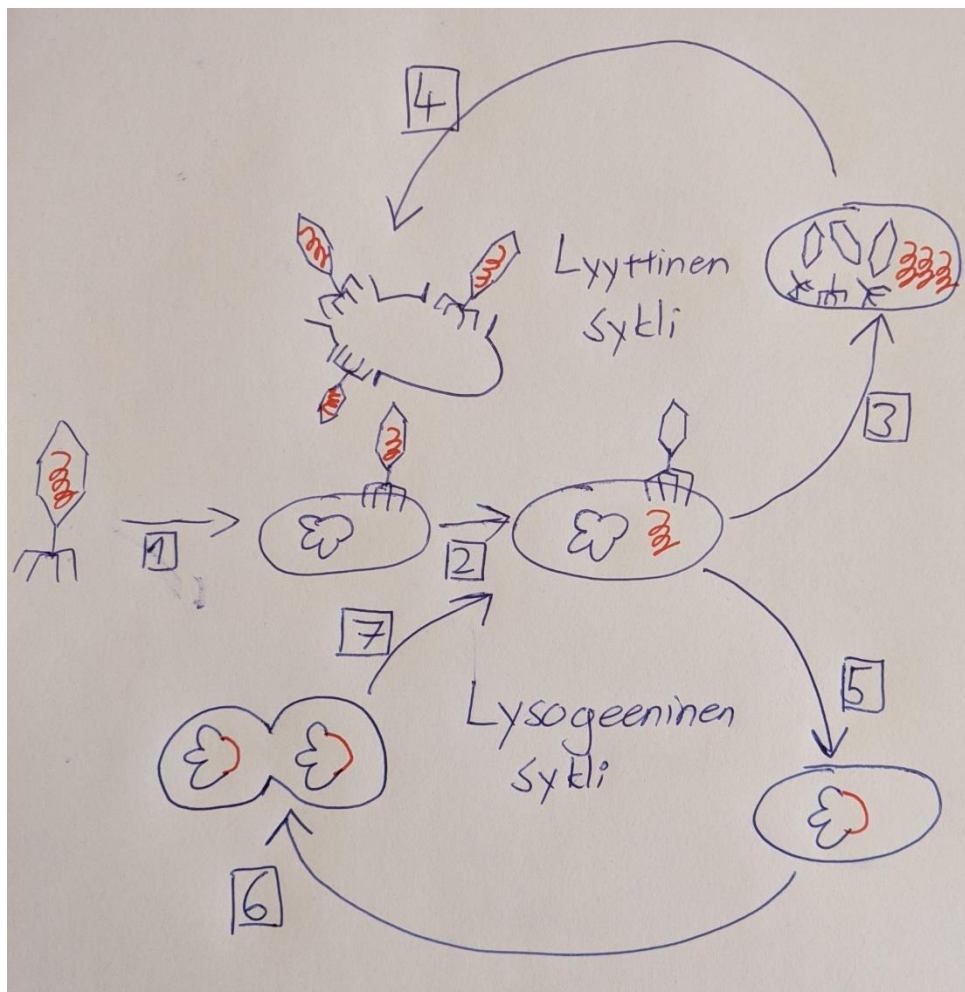
Myoviridae-bakteriofageilla on supistuva häntä, kun taas *Siphoviridae*-faageilla on pitkä sekä taipuisa ja *Podoviridae*-faageilla lyhyt supistumaton häntä (kuva 1) (Weinbauer 2004).

2.3 Bakteriofagien elinkierto

Bakteriofagit on perinteisesti jaettu elinkiertonsa eli syklinsä mukaan joko lyyttisiin tai lysogeenisiin bakteriofageihin. Bakteriofagihoidossa käytetään lyyttisiä bakteriofageja (Skurnik ym. 2007).

2.3.1 Lyyttiset bakteriofagit

Lyyttisessä elinkierrossa olevia bakteriofageja kutsutaan yleensä joko lyyttisiksi tai virulenteiksi faageiksi. Tapahtumalle on ominaista bakteriofagin replikaatio ja infektion päättyminen isäntäsolun hajoamiseen. Lyyttisen elinkierron vaiheet ovat adsorptio, perimän injektointi, viruksen perimän replikointi ja ekspressio, uusien viruspartikkeleiden muodostus, isäntäbakteerin hajoaminen ja bakteriofagien vapautuminen (kuva 2) (Skurnik ja Strauch 2006).



Kuva 2. Bakteriofagin lyyttinen ja lysogeeninen elinkierto. Yhteiset vaiheet: 1) Bakterin tunnistaminen ja bakteriofagin adsorptio, 2) perimän (punainen) injektointi. Lyyttinen elinkierto: 3) viraalisen genomien replikaatio ja proteiinisynteesi, 4) isäntäbakteerin hajotus ja uusien virusten vapautuminen. Lysogeeninen elinkierto: 5) virusgenomin integroituminen bakteerin perimään profaagiksi 6) profaagin lisääntyminen isäntäbakteerin jakautuessa, 7) ärsyke voi indusoida lyyttisen syklin. (Kuva: Juhani Ikonen)

Adsorptio eli bakteriofagin kiinnittyminen bakteeriin on tärkein bakteriofagin spesifisyyttä määräävä vaihe (Skurnik ja Kiljunen 2016). Bakteriofagit voivat käyttää reseptoreina monia bakteerin pintarakenteita kuten esimerkiksi kapselia, lipopolysakkaridien osia, flagelloita tai fimbrioita. Jotkut bakteriofagit hyödyntävät myös bakteerin kapselia hajottavia entsyymeitä päästäkseen kiinnittymään bakteerin soluseinään (Skurnik ja Strauch 2006). Kiinnittymisen jälkeen bakteriofagit käyttävät joko kapsidissa tai hännässä olevia entsyymeitä apunaan perimän injektiossa bakteerin sytoplasmaan kapsidin pysyessä solun ulkopuolella.

Seuraavaksi bakteriofagi ottaa hallintaansa bakteerin aineenvaihduntakoneiston tuottamaan viruksen nukleiinihappoja sekä proteiineja (Weinbauer 2004). Proteiinit voidaan jakaa varhaisiin ja myöhäisiin, joista varhaiset liittyvät genomien replikaatioon sekä isäntäbakteerin inhibitioon ja myöhäiset lähinnä uusien viruspartikkeleiden valmistukseen sekä bakteerisolun hajotukseen (Drulis-Kawa ym. 2012). Lopulta uudet bakteriofagit vapautuvat tuottamiensa entsyymien kuten holiinien ja endolysiinien avulla hajottamastaan isäntäbakteerista ympäristöön (Skurnik ja Kiljunen 2016).

2.3.2 Lysogeeniset bakteriofagit

Lysogeeniset eli temperaatit bakteriofagit replikoituvat hyvin vähän infektion jälkeen ja lisääntymisen sijaan bakteriofagin perimä yhdistyy bakteeriin genomiin tai säilyy bakteerin sisällä plasmidina (Weinbauer 2004). Lysogeenisen bakteriofagit elinkierron vaiheet ovat osin samat kuin lyttisen bakteriofagin (kuva 2). On arvioitu, että suurin osa (90 %) bakteriofageista olisi temperaatteja. Genomiin integroitunutta bakteriofagia kutsutaan profaagiksi ja sen omaan replikaatioon liittyvät geenit eivät ekspressoidu, eikä uusia viruksia siten synny. Sen sijaan isäntäbakteeri voi hyötyä profaagin sisältämistä geeneistä, jotka voivat antaa bakteerille uusia ominaisuuksia. Kuitenkin myös lysogeniassa bakteriofagi periaatteessa lisääntyy, koska isäntäbakteerin jakautumisen yhdessä myös profaagi kopiutuu bakteerigenomin mukana molemmille tytärsolulinjoille (Weinbauer 2004). Profaagi voi siirtyä lyttiseen sykliin aktivoiduttuaan ulkoisen tekijän vaikuttaessa isäntäsoluun (Skurnik ja Strauch 2006). Useilla bakteriofageilla esimerkiksi isäntäsolun DNA:n vaurio johtaa profaagin aktivoitumiseen (Quinones ym. 2005). Myös toisen lyttisen bakteriofagin infektio voi olla profaagin aktivoiva ärsyke (Scott ym. 2007).

2.3.3 Bakteriofagien muita elinkiertoja

Lyttisen ja lysogeenisen elinkierron lisäksi kirjallisuudessa on kuvattu kaksi muutakin bakteriofagien elinkiertoa. Pseudolysogenia liittyy isäntäsolun huonoon kasvu-ympäristöön ja sitä nähdään sekä lyttisillä että lysogeenisillä bakteriofageilla. Isäntäsolussa bakteriofagin perimä jää pysähtyneen kehityksen tilaan, eikä perimä replikoidu isäntäsolun mukana. Tällöin bakteerin jakaannuttua syntyy kaksi tytärsolulinjaa, infektoitu sekä infektoimaton.

Olosuhteiden parannuttua bakteriofagi voi aktivoitua ja aloittaa joko lyttisen ja lysogeenisen elinkierron (Cenens ym. 2013).

Krooninen infektio muistuttaa lyttistä elinkiertoa ja siinä viruspartikkeleita tuotetaan aktiivisesti kuitenkin ilman isäntäbakteerin hajottamista. Uudet bakteriofagit vapautuvat bakteerista eri tavoin kuten kuroutumalla (Hobbs ja Abedon 2016).

3 BAKTERIOFAGIHOITO

3.1 Uusi tuleminen

Bakteriofagien bakteereita hajottavan eli lyyttisen vaikutuksen huomasi ensimmäisenä brittiläinen bakteriologi Ernest Hankin, joka havaitsi vuonna 1896 Ganges-joesta suodatetun veden hillitsevän kolerabakteerin kasvua (Summers 2001). Varsinaisesti bakteriofagien löytäjiksi huomioidaan Frederick Twort ja Felix d’Herelle, jotka kummatkin tahoillaan kuvailivat bakteriofagien ominaisuuksia 1910-luvulla. D’Herelle keksi nimen bakteriofagi eli bakteerinsyöjä. Etenkin d’Herelle oli kiinnostunut bakteriofagien terapeuttisista mahdollisuuksista, ja hän teki ensin joitakin salmonellatutkimuksia siipikarjalla. Myöhemmin 20-luvulla d’Herelle kokeili bakteriofagien turvallisuutta ihmisillä, ajalleen tyypillisesti, syömällä ja piikittämällä itseensä faageja. Kirjallisuuden mukaan hän onnistui hoitamaan eräitä suolistotulehduksia sekä paiseruttotapauksia *Yersinia*-faageilla (Summers 2001). Näiden tulosten rohkaisemana 30-luvulla bakteriofagit tulivat enemmän valtavirtaan, niitä tutkittiin, ja lääkeyritykset markkinoivat bakteriofageja ylisanoin ja monin paikoin liioitellen. Tehdyt tutkimukset antoivat ristiriitaisia tuloksia bakteriofagien tehosta. Tuloksiin saattoi vaikuttaa osaltaan ajalleen tyypilliset mutta nykymittapuulla vaillinaiset tutkimukset ja huono ymmärrys bakteriofagien biologiasta (Summers 2001). Nämä ongelmat yhdistettynä toisen maailmansodan syttymiseen ja helposti valmistettavan sekä tehokkaan penisilliinin löytäminen johtivat 40-luvun lopussa bakteriofagiterapian sekä tutkimuksen pysähtymiseen länsimaissa (Schmidt 2019). Sen sijaan bakteriofagien käyttö jatkui edelleen näihin päiviin asti entisen Neuvostoliiton alueella, erityisesti Georgiassa. Lännessä bakteriofagien tutkimusta vaivasi pitkään asiaan liittymättömät poliittiset jännitteet lännen ja idän välillä. Bakteriofagitutkimukseen ei käytännössä ollut enää lännessä tarjolla rahoitusta 70-luvulta lähtien, kunnes ala tuli uudelleen ajankohtaiseksi 2000-luvun alussa kehittyneen sekvensointiteknologian ja mikrobilääkeresistenssin takia (Schmidt 2019).

3.2 Bakteriofagien eristäminen

Ympäristön valtavasta bakteriofagien määrästä voi olla haastavaa eristää juuri halutulle bakteerille soveltuva bakteriofagi. Mahdollisuuksia voidaan parantaa kohdentamalla

etsimistä paikkoihin, joista faagin isäntäbakteeria oletetaan löytyvän (Hyman 2019). Jätevesi on ollut pitkään tämän takia tutkijoiden kiinnostuksen kohteena (Shende ym. 2017).

Eräässä tutkimuksessa jyväskyläläisestä jätevedenpuhdistamosta otetuista näytteistä etsittiin bakteriofageja tietyille mikrobilääkkeille resistentille bakteerikannoille (Mattila ym. 2015). Useasta tutkitusta jätevesinäytteistä pystyttiin eristämään bakteriofageja usealle resistentille patogeeneille, näitä olivat *Pseudomonas aeruginosa*, laajakirjoista beetalaktamaasia tuottava *Escherichia coli* sekä joukko salmonellabakteereita. Sen sijaan jätevedestä löytyi todella niukasti bakteriofageja tutkituille metisilliiniresistentille *Staphylococcus aureus* -kannoille.

Bakteriofagien eristämiseen nykyäänkin käytettyä rikastusmenetelmää hyödynsi aikanaan jo faagipioneeri d'Herelle (Hyman 2019). Rikastuksessa ympäristöstä kerätty näyte sentrifugoidaan sekä suodatetaan epäpuhtauksien poistamiseksi, minkä jälkeen näyte ja tutkittava bakteeri sekoitetaan keskenään. Seoksen annetaan inkuboitua yleensä yön yli, jolloin mahdollisesti näytteessä ollut tutkittavan bakteerin faagi monistuu (Mattila ym. 2015). Näin saatu lusaatti puhdistetaan bakteereista ja se lisätään tutkittavaa bakteeria sisältävälle maljalle. Mikäli näytteessä on haluttua bakteriofagia inkuboinnin jälkeen, maljan bakteerikasvustoon muodostuu kirkkaita kohtia eli plakkeja, joista bakteriofagi on tappanut bakteerit (Mattila ym. 2015).

Eristetty ja plakin muodostanut bakteriofagi tulee seuraavaksi tyypittää ominaisuuksiensa suhteen (Hyman 2019). Viitteitä saadaan jo plakin ulkonäöstä: kirkas plakki tarkoittaa yleensä bakteriofagin pystyneen tuhoamaan merkittävästi bakteeria ollen todennäköisesti lyyttinen bakteriofagi. Sen sijaan samea plakki voi tarkoittaa temperaattia faagia. Tämä on kuitenkin epävarma tapa luokitteluun ja plakeista eristetyt bakteriofagit tulisikin aina tutkia koko genomin sekvensoinnilla, jossa voidaan selvittää bakteriofagilla mahdollisesti olevia lysogeniaan liittyviä geenejä (Skurnik ym. 2007). Samalla bakteriofagia tarkastellaan muidenkin ominaisuuksien kuten toksiini- tai resistenssigeenien olemassaolon suhteen. Genomista voidaan arvioida myös bakteriofagin isäntäkirjoa (Hyman 2019). Ennen annostelua lysaatista tulee vielä puhdistaa siinä mahdollisesti olevat haitalliset aineet kuten endotoksiinit (Hietala ym. 2019).

3.3 Bakteriofagihoidon toteuttaminen

Ennen bakteriofagihoidon aloittamista tulee sulkea muut kuin bakteeriperäiset infektiiviset syyt pois (Skurnik ja Kiljunen 2016). Bakteriofagivalmiste voi sisältää yhtä tai useampaa bakteriofagia, jolloin puhutaan faagiseoksesta. Yksilöllisessä tai personoidussa hoidossa tulehduksen aiheuttajabakteeri eristetään ja sen bakteriofagiherkkyys määritetään. Näin voidaan valita hoitoon mahdollisimman tehokas bakteriofagi tai bakteriofagiseos juuri kyseisen infektion patogeeneille. Toisena vaihtoehtona on käyttää valmiita faagiseoksia, jolloin valmistetta on mahdollista käyttää jo pelkän kliinisen kuvan perusteella (Skurnik ja Kiljunen 2016). Tätä lähestymistapaa on käytetty ihmisten hoidossa Venäjällä ja Georgiassa, joissa valmiita bakteriofagivalmisteita voi melko vapaasti hankkia itselleen taudinkuvan perusteella (Patey ym. 2018). Eri puolille maailmaa humaanilääketieteessä rakennetaan parhaillaan ns. faagipankkeja, joihin talletetaan hyvin tyypitettyjä patogeenien bakteriofageja (Skurnik ja Kiljunen 2016).

Bakteriofagivalmisteet luetaan Euroopan unionissa lääkkeiksi, eikä kirjallisuuskatsausta tehdessä EU:n alueella ole markkinoilla bakteriofageihin perustuvaa lääkevalmistetta ihmisten tai eläinten infektiosairauksien hoitoon (Pelfrene ym. 2016). Valmiit bakteriofagivalmisteet, joiden sisältämien bakteriofagien koostumus, määrä ja ominaisuudet ovat hyvin ennalta tiedossa, vastaavat enemmän perinteisiin lääkkeisiin liittyviä säädöksiä (Pirnay ym. 2011). Sen sijaan personoidulle, vain yhdelle potilaalle suunnitellulle ja käytettävälle valmisteelle ei löydy suoraa vertailukohtaa nykyisessä EU:n lääkelainsäädännössä. Bakteriofagivalmisteen saamisen markkinoille odotetaan olevan helpompaa eläimille ja onkin mahdollista, että bakteriofagia sisältävä eläinlääke nähdäänkin markkinoilla ensin johdattamassa tietä myös ihmisvalmisteelle (Pelfrene ym. 2016).

Bakteriofagien annostelusta saatavilla oleva tieto on niukkaa (Patey ym. 2018). Tutkimusta tarvitaan esimerkiksi hoidon optimaalisten annoksien, antokertojen ja keston selvittämiseen. Teoriassa bakteriofagihoito tarvitsee vain yhden antokerran, koska bakteriofagi pystyy itse lisääntymään elimistössä (Skurnik ja Kiljunen 2016). Todennäköisesti hoidossa tarvittavan vasteen saamiseen tarvitaan kuitenkin useampi antokerta (Patey ym. 2018).

Bakteriofagihoidon farmakologiaa ymmärretään vielä tavanomaisiin lääkevaihtoehtoihin nähden erittäin huonosti, jolloin eläimessä tapahtuvan bakteriofagin replikaation ennustaminen on vaikeaa.

3.4 Bakteriofagihoidon farmakologiaa

Eläinten ja ihmisten tutkimuksissa bakteriofageja on yleensä annosteltu suun kautta, joka on helppo tapa viedä bakteriofageja suolistoon ja sieltä muualle elimistöön (Kutter ym. 2010). Bakteriofagien herkkyys mahalaukun alhaiselle pH:lle vaihtelee suuresti ja tutkimuksissa käytetäänkin usein happamuutta vähentäviä antasideja tai bakteriofagivalmisteen kapselointia (Malik ym. 2017). Haponsietoa pystytään lisäämään myös muokkaamalla bakteriofageja geneettisesti (Nobrega ym. 2016). Bakteriofagien on havaittu olevan yleisesti melko kestäviä niin ruuansulatusentsyymeille kuin myös sapelle (Verthé ym. 2004). Nykyisen tiedon valossa bakteriofagien imeytyminen systeemiverenkiertoon suun kautta annosteluna on huonoa (Dąbrowska 2019).

Hengitysteistä imeytyminen systeemiverenkiertoon on enteraalista annostelua parempaa, mutta kuitenkin huomattavasti injektioita heikompaa (Dąbrowska 2019). Bakteriofagien suurehkot, proteiinipitoiset kapsidit estävät tehokasta imeytymistä ihon läpi (Ryan ym. 2012). Topikaalista annostelua on kuitenkin käytetty menestyksekkäästi haavojen hoidossa (Marza ym. 2006). Kaikkein parhaat tulokset systeemisen jakautumisen osalta on saatu erilaisilla injektioilla (vatsaontelo, lihas, ihonalaiskudos ja laskimo) (Dąbrowska 2019).

Systeemisesti annostellut bakteriofagit kerääntyvät tyypillisesti maksaan ja pernaan, joissa retikuloendotelialijärjestelmä poistaa niitä verenkierrosta (Jończyk-Matysiak ym. 2017). Bakteriofageja on löydetty lähestulkoon kaikkialta elimistöstä systeemisen annon jälkeen, mikä tarkoittaa niiden pystyvän siirtymään, ainakin teoriassa, infektiota aiheuttavan bakteerin luo kudoksesta riippumatta (Dąbrowska 2019). Bakteriofagien on näytetty myös ylittävän veri-aivoesteen (Pouillot ym. 2012).

3.5 Bakteerien ja bakteriofagien vuorovaikutus

Bakteerit ja bakteriofagit ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Tämä aiheuttaa kummallekin evoluutiopaineen, jossa bakteereille kehittyy tapoja estää bakteriofagi-infektio ja bakteriofageille puolestaan keinoja näiden kiertämiseen. Bakteriofagihoidon kehittyminen edellyttää näiden vuorovaikutusten tutkimista ja ymmärtämistä (Hampton ym. 2020).

Voidakseen infektoida isännän bakteriofagin tulee kiinnittyä bakteerin pintaan. Adsorptio tapahtuu bakteriofagin tunnistaessa bakteerin tietyn reseptorirakenteen (Skurnik ja Strauch 2006). Yksinkertainen tapa infektion estämiseen onkin reseptorin muokkaaminen tai peittäminen (esim. biofilmin muodostus) niin, ettei bakteriofagi enää tunnista sitä (Hyman ja Abedon 2010). Eräät bakteerit, kuten *Escherichia coli*, pystyvät tuottamaan reseptoreilla päällystettyjä solunulkoisia vesikkeleitä, jolloin bakteriofagin replikaatio vähentyy (Hampton ym. 2020). Reseptorin mutatoituessa bakteriofagit voivat siirtyä käyttämään toista reseptoria tai bakteriofagien joukosta valikoituu muuttuneen reseptorin tunnistavia yksilöitä (Hampton ym. 2020). Biofilmikään ei tuota erälle bakteriofageille ongelmia, koska niiden depolymeraasi-entsyymi paljastaa reseptorin hajottamalla biofilmin rakennetta (Parasion ym. 2014).

Lysogeenisen bakteriofagin infektio voi suojata bakteeria muilta bakteriofageilta. Tämä edellyttää bakteerin genomiin integroituneessa profaagissa olevan tiettyjä usean eri bakteriofagin yhtäaikaista infektiota eli superinfektiota estäviä geenejä (Loc-Carrillo ja Abedon 2011). Bakteriofagit pystyvät estämään toistensa perimän ruiskutusta bakteeriin, genomien replikaatiota tai proteiinisynteesiä. Esto voi olla hyvinkin spesifinen ja koskea vain yhtä bakteriofagia (Hampton ym. 2020).

Valtaosa bakteerisoluista voi tunnistaa vierasta DNA:ta restriktio-modifikaatiojärjestelmällä. Järjestelmä on erittäin monimuotoinen ja se pystyy toimimaan suurinta osaa DNA-genomisia bakteriofageja vastaan (Hyman ja Abedon 2010). Järjestelmä koostuu bakteerin omaa perimää metyloivasta metyyliitransferaasista sekä metyloimatonta DNA:ta pilkkovista restriktioentsyymeistä (Hampton ym. 2020). Yksinkertainen mutaatio restriktioentsyymin tunnistuskohdassa voi tehdä bakteriofagista vastuskykyisen kyseiselle järjestelmälle (Hyman ja Abedon 2010). Eräät bakteriofagit voivat saada bakteerin metyloimaan itsensä ja siten säästymään pilkkomiselta. Muita bakteriofagien tapoja kiertää tunnistus ovat esimerkiksi käyttää restriktioentsyymeitä inhiboivia proteiineja tai vaihtaa DNA:n tyymiini urasiilijohdannaiseen (Hyman ja Abedon 2010).

CRISPR-alueet (engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ja Cas-proteiinit (engl. CRISPR associated protein) muodostavat pohjan nykyaikaisille geenimuokkaustekniikoille (ns. geenisakset). Näiden menetelmien juuret liittyvät tiiviisti bakteerien ja bakteriofagien väliseen kamppailuun. Alun perin CRISPR on bakteereilta

löydetty puolustusmekanismi bakteriofageja vastaan ja järjestelmä pystyy tunnistamaan sekä hajottamaan vierasta geneettistä materiaalia bakteerisolun sisällä (Rath ym. 2015). CRISPR eroaa restriktio-modifikaatiojärjestelmästä spesifisyydellään, ja järjestelmän toimintaa onkin kuvattu alkeelliseksi bakteerien adaptiiviseksi immunitetiksi, koska se kykenee tallentamaan pätkiä bakteriofagin genomista viruksen myöhempää tunnistamista varten (Rath ym. 2015). Näin hankittu immunitetti myös periytyy bakteerin tytärsoluille (Hampton ym. 2020). CRISPR on löydetty lähes joka toisesta tutkitusta bakteerista (Horvath ja Barrangou 2010). Usein bakteriofageille riittää pelkkä pistemutaatio tunnistettavalla alueella CRISPR-järjestelmän ohittamiseen (Deveau ym. 2008). Lisäksi eräät bakteriofagit tuottavat proteiineja, jotka estävät bakteriofagien CRISPR-pohjaista tunnistamista (Bondy-Denomy ym. 2013).

Abortiivisessa infektiossa bakteerisolku kuolee ilman viruksen replikaatiota. Tapahtumalle on ominaista bakteriofagin onnistunut tunkeutuminen bakteeriin sekä infektion päättyminen bakteerin ja bakteriofagin kuolemaan ennen uusien virusten vapautumista (Hampton ym. 2020). Abortiivista infektiota pidetään melko spesifisenä kohteena olevan bakteriofagin suhteen. Tapahtuman on ajateltu olevan bakteerille altruistinen, eli bakteeri kuolee itse säästäten muun bakteeripopulaation uusilta bakteriofageilta (Hyman ja Abedon 2010). Mekanismit abortiivisen infektion taustalla ovat hyvin kirjavia sekä suurelta osin tuntemattomia, samoin kuin bakteriofagien adaptaatiot niihin (Hampton ym. 2020).

3.6 Bakteriofagihoidon hyötyjä

Bakteriofagien spesifisyys on bakteriofagihoidon suurimpia hyötyjä. Hoidon vaikutus voidaan kohdistaa hyvin rajalliseen joukkoon bakteereita, jopa ainoastaan yhden lajin tiettyyn kantaan (Kortright ym. 2019). Tämä on merkittävä etu mikrobilääkkeisiin verrattuna, koska bakteriofagihoito säästää elimistön hyödyllisiä bakteereita ja estää opportunististen bakteereiden liikakasvua sekä resistenttien bakteereiden muodostumista (Domingo-Calap ja Delgado-Martínez 2018).

Ympäristössä on lähes lukematon määrä geneettisesti hyvin vaihtelevia bakteriofageja (Weber-Dąbrowska ym. 2016). Bakteriofagien eristäminen halutulle bakteerille on niiden monimuotoisuuden vuoksi yleensä melko suoraviivaista (Skurnik ja Kiljunen 2016). Tämä

tekee myös bakteriofagien tuotannosta kustannustehokasta ja hoitovalmisteen kehitystyö vaatii vähemmän resursseja mikrobilääkkeisiin nähden (Chan ym. 2013).

Bakteriofageilla voidaan tappaa mikrobilääkkeille resistenttejä bakteereita, koska ne toimivat solutasolla eri tavalla kuin mikrobilääkkeet (Nikolich ja Filippov 2020). Lisäksi poikkeavista vaikutusmekanismeista voidaan hakea synergistisiä hyötyjä yhdistämällä mikrobilääke ja bakteriofagi, jolloin joissakin tapauksissa on saatu parempia tuloksia kuin kummallakaan hoitomuodolla erikseen (Kortright ym. 2019). Esimerkkinä tästä kokeellisessa kolibasilloosissa kontrolliryhmässä (ei hoitoa) broilereiden kuolleisuus oli 68 %, enrofloksasiinilla hoidettujen 3 %, bakteriofageilla hoidettujen 15 % ja yhdistämällä enrofloksasiini sekä bakteriofagi kuolleisuutta ei enää havaittu (Huff ym. 2004).

Mielenkiintoisesti bakteriofagien on myös todettu voivan palauttaa resistentin bakteerikannan herkkyuden mikrobilääkkeelle (Tagliaferri ym. 2019). Kaikilla tutkituilla yhdistelmillä synergismia ei ole havaittu, ja jossain tapauksissa bakteriofagien määrä ja tehokkuus on hetkellisesti laskenut annosteltaessa sitä yhdessä mikrobilääkkeen kanssa (Torres-Barcelo ym. 2018).

Bakteriofagien annostelu on mikrobilääkkeistä eroavaa: Mikrobilääkkeitä joudutaan tavanomaisesti antamaan useana päivänä, kun taas bakteriofagit säätelevät itse omaa konsentraatiotaan. Tämä tarkoittaa bakteriofagin pystyvän lisääntymään, kunnes se on tuhonnut isäntäbakteerinsa ja sen jälkeen myös faagi häviää (Moelling ym. 2018).

Bakteriofageja annostelu seoksena laajentaa hoidon isäntäkirjoa ja vähentää resistenttien bakteereiden kehittymisen riskiä (Nikolich ja Filippov 2020).

3.7 Bakteriofagihoidon haasteita

Bakteriofagihoidon turvallisuudessa on edelleen avoimia kysymyksiä, vaikka sitä oikein toteutettuna pidetäänkin turvallisempaa ja paremmin siedettynä kuin mikrobilääkkeitä (Skurnik ja Kiljunen 2016, Kakasis ja Panitsa 2019, Principi ym. 2019). Yhdeksi kysymykseksi on nostettu tietämättömyys suuresta osasta bakteriofagien geenien toiminnasta, koska yhdenkin emäksen ero genomissa voi muuttaa bakteriofagin toimintaa ja siten vaikuttaa bakteriofagihoidon tehokkuuteen sekä turvallisuuteen (Krylov ym. 2015).

Kirjallisuuskatsausta tehdessä ainoa löydetty bakteriofagihoidon komplikaatio liittyi huonosti puhdistettuun lyaattiin jääneisiin endotoksiineihin (Meira ym. 2013).

Pitkäaikainen ja laaja-alainen käyttökokemus bakteriofagien käytöstä puuttuu. Tämän takia resistenssin muodostuminen täytyy pitää mielessä ja asiaa tutkia, vaikka bakteriofagit voivat muuntua nopeasti ja geenimuokkaustekniikka on olemassa (Verbeken ym. 2014).

Bakteriofagien käyttöä tuotantoeläimillä voi myös hidastaa kuluttajien epäluulo uusia hoitomuotoja kohtaan (Fernández ym. 2018). Toisaalta ruoan luonnollisuus ja keinotekkoisten lisäaineiden välttäminen ovat kasvavia trendejä, mikä voi lisätä mielenkiintoa bakteriofageja kohtaan ruoantuotantoketjun eri vaiheissa (Moye ym. 2018).

Kaikki bakteriofagit eivät ole soveltuvia faagiterapiaan ja jokainen hoitoon suunniteltava bakteriofagi tulisi todeta lyyttiseksi (Skurnik ja Kiljunen 2016). Lisäksi bakteriofagin genomi olisi sekvensoitava ei-toivottavien ominaisuuksien kuten toksiini- tai mikrobilääkeresistenssigeenien suhteen (Skurnik ym. 2007). Temperaatit bakteriofagit voivat integroida genominsa bakteerin perimään, ja tällöin bakteeri saa profaagissa olevia uusia mahdollisesti virulenssia lisääviä geenejä käyttöönsä (Loc-Carrillo ja Abedon 2011). Transduktio lisää riskiä myös superinfektioimmunitettiin, jolloin bakteriofagille sensitiiviset bakteerit muuttuvat resistenteiksi (Hyman ja Abedon 2010).

Bakteriofagien spesifisyys tuo hyötyjen lisäksi mukanaan myös ongelmia bakteriofagihoidon toteuttamisessa. Yksittäisen bakteriofagin isäntäkirjo ei yleensä riitä hoidettaessa geneettisesti monimuotoisen bakteerin aiheuttamaa infektiota (Nikolich ja Filippov 2020). Tätä ongelmaa voidaan kuitenkin vähentää yhdistämällä hoitoon useampi bakteriofagi (Chan ym. 2013). Yleensä nämä useankin bakteriofagin yhdistelmähoitot ovat enemmän selektiivisiä kuin tyypilliset kapeakirjoiset mikrobilääkkeet, minkä voi laskea faagihoidon eduksi (Kutateladze ja Adamia 2010).

Lyyttisten bakteriofagien, aivan kuten myös mikrobilääkkeiden, tuhotessa gram-negatiivisia bakteereita ympäristöön vapautuu endotoksiineja, jotka ovat erittäin potentteja tulehduksen välittäjiäaineita ja niiden vapautuminen suurina määrinä voi johtaa pahimmillaan septiseen shokkiin (Dufour ym. 2017). Bakteriofagit voivat mahdollisesti olla tältä osin mikrobilääkkeitä turvallisempi vaihtoehto, yksittäisessä tutkimuksessa todettiin *Escherichia coli* -bakteerin vapauttaman endotoksiinin määrän olevan pienempi

bakteriofageilla kuin tietyillä beetalaktaamiantibiooteilla (Dufour ym. 2017). Bakteriofagien geenimuuntelulla voidaan edelleen vähentää endotoksiinien vapautumista (Pires ym. 2016). Bakteriofagien tuottamisen yhteydessä lymfaattien voi päätyä hajotettujen bakteereiden endotoksiinien lisäksi muita bakteereiden ympäristöön erittämiä toksineja. Tätä ongelmaa pyritään estämään erilaisilla lymfaattien suodatus- ja puhdistusmenetelmillä, joita kehitetään koko ajan pidemmälle (Hietala ym. 2019).

Elimistön immuunijärjestelmä tunnistaa bakteriofagit ja tuottaa vasta-aineita niitä vastaan, mikä voi johtaa ongelmiin tarvittaessa useampia hoitokertoja samalla bakteriofagilla (Skurnik ja Kiljunen 2016). Bakteriofagien valinnassa tulisi ottaa huomioon, että bakteriofagien proteiinin rakenne ja siten myös immunogeenisyys on erittäin vaihtelevaa (Krut ja Bekeredjian-Ding 2018). Geenimuuntelulla on teoriassa mahdollista poistaa vahvasti immuunijärjestelmää stimuloivia proteiineja ja saavuttaa näin parempia tuloksia useamman kerran hoidoissa. Tämänhetkisen tiedon valossa bakteriofagien immunogeenisyyden ei arvella olevan hoidon turvallisuuden kannalta ongelma (Krut ja Bekeredjian-Ding 2018).

4 BAKTERIOFAGIEN KÄYTTÖ ELÄINLÄÄKETIEDESSÄ

4.1 Nauta

Lypsykarjan yleisimpiä infektiosairauksia ovat utaretulehdus, jälkeisten jäämisen aiheuttama kohtutulehdus sekä hengitystiesairaudet (Mörk ym. 2009). Kaikki nämä sairaudet aiheuttavat taloudellisia tappioita tilallisille maitomäärien laskuna, poistojen lisääntymisellä sekä eläinlääkärinkuluina. Mikrobilääkkeitä on käytetty maailmalla karjan infektioiden ennaltaehkäisyyn sekä hoitoon, mutta niiden käyttöön liittyy lisääntynyt huoli vaikutuksista ympäristöön, mikrobilääkeresistenssiin sekä ihmisten terveyteen. Näiden seikkojen takia mikrobilääkkeiden käyttö tuotantoeläimillä onkin muuttunut monissa maissa entistä vastuullisemmaksi, vaikka mikrobilääkkeiden tiukka rajoittaminen tai kokonaan kieltäminen johtaa merkittävään tuotantokustannusten nousuun (Lhermie ym. 2018). Tähän vaikuttaa niin sairauksien esiintyvyys kuin uusimis- ja teurastuskustannukset sekä maidon hinta.

4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Bakteriofagien käyttöä on tutkittu naudalla eniten utaretulehduksen eli mastiitin hoidossa. Suuri osa tästä tutkimuksesta on keskittynyt *Staphylococcus aureus* -bakteeriin, sen yleisyyden sekä mikrobilääkeresistenssin takia. *S. aureus* aiheuttaa usein persistoivan subkliinisen tai kroonisen utaretulehduksen, mihin vaikuttaa erityisesti bakteerin kyky muodostaa biofilmejä (Pyörälä ja Tiihonen 2005). Lisäksi *S. aureus* on fakultatiivisesti intrasellulaarinen patogeeni pystyen näin väistämään elimistön immuunijärjestelmää. Nämä *S. aureus* -bakteerin ominaisuudet tekevät siitä hankalan hoitaa mikrobilääkkeillä ja usein hoitotulokset ovat keuhkoja (Pyörälä ja Tiihonen 2005).

Bakteriofageilla saavutetut tulokset utaretulehduksen hoidossa ovat olleet vaihtelevia. Varhainen tutkimus utareeseen annostellusta bakteriofagista (faagi K) mastiitin hoidossa paransi vain 16,7 %, mikä ei ollut tilastollisesti merkitsevä kontrolliryhmään (ei hoitoa) verrattuna (Gill ym. 2006). Tämä voi johtua maidon proteiinien ja rasvan aiheuttamasta faagi K:n inaktivaatiosta (O'Flaherty ym. 2005). *S. aureus* puolestaan pystyy vastustamaan maidon antimikrobisia aineita ja kasvamaan nimenomaan maidossa (Pyörälä ja Tiihonen 2005).

Bakteriofageista eristetyt endolysiinit ovat yksi mahdollinen utaretulehduksen hoitovaihtoehto, ja tätä on tutkittu jonkin verran hiirimalleissa. Esimerkiksi muokatulla streptokokkifaagin endolysiinillä saavutettiin huomattava *S. aureus* -bakteerimäärän alenema (Schmelcher ym. 2012). Sama ryhmä on saanut vastaavia tuloksia myös *Streptococcus*-ryhmään kuuluvilla patogeeneilla (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* ja *S. uberis*) (Schmelcher ym. 2015). Myös *Escherichia coli* -bakteerin aiheuttaman mastiitin hoidossa hiirillä on edistytty ja saatu lupaavia tuloksia (da Silva Duarte ym. 2018).

Endolysiinihoitoa on kokeiltu myös lehmällä ja alustavien tulosten mukaan tietystä *S. aureus* -bakteriofagista eristetyllä endolysiinillä voitaisiin hoitaa lievää kliinistä utaretulehdusta (Fan ym. 2016). Tutkimuksessa annettiin 20 mg endolysiiniä utareeseen kerran päivässä. Kolmen päivän hoitjakson aikana maidon somaattisten solujen sekä *S. aureus* -bakteerien määrät vähenivät.

Vuonna 2020 julkaistiin mielenkiintoinen *in vitro* -tutkimus, jossa testattiin voiko *S. aureus* -bakteerin aiheuttaman utaretulehduksen hoidossa saada synergiaetua yhdistämällä maitohappobakteerin (*Lactobacillus plantarum*) ja lyttisten bakteriofagien seoksen (Titze ja Krömker 2020). Maitohappobakteerien käytöstä lehmän eräänlaisena probioottina utaretulehduksen torjunnassa on jonkin verran näyttöä (Frola ym. 2012). Tutkimukseen valitulla *L. plantarum* -kannalla on todettu useita patogeenien kasvua häiritseviä tekijöitä kuten kyky kolonisoida epiteeliä, kilpailla ravinteista sekä tuottaa bakteriosiinejä eli toisten bakteereiden kasvua estäviä aineita (Titze ja Krömker 2020). Maitohappobakteerin ei yksinään havaittu estävän merkittävästi *S. aureus* -bakteerin kasvua yhden vuorokauden inkubaatioajan jälkeen. Bakteriofagiseoksella sekä yhdistelmähoidolla päästiin parempiin tuloksiin, mutta synergiaetua ei havaittu (Titze ja Krömker 2020). Yhtenä syynä tulokseen voi olla maitohappobakteerin vaatima pidempi inkubaatioaika, minkä jälkeen yhdistelmähoito olisi mahdollisesti pelkkää bakteriofagihoitoa tehokkaampaa. Tutkijat ehdottavatkin utareessa tehtävää lisätutkimusta, jossa teorian mukaan bakteriofagit voisivat ensin hajottaa suuren osan patogeenistä ja maitohappobakteeri kolonisoisi utareen estäen utaretulehduksen uusiutumisen (Titze ja Krömker 2020).

4.1.2 *Escherichia coli*

Naudan kohtutulehdus eli metriitti on hyvä esimerkki, jossa bakteriofagin hyvää tehoa *in vitro* ei ole saatu siirrettyä käytäntöön. Teoriassa useampi seikka puoltaa bakteriofagien käyttöä metriitin hoidossa (Santos ym. 2010). Navettaympäristöstä on melko helppo eristää tehokkaita bakteriofageja metriittiä yleisesti aiheuttavaa *Escherichia coli* -bakteeria vastaan (Santos ym. 2010). Lisäksi naudan kohtutulehduksen bakteerimäärä on yhteydessä metriitin kliiniseen vakavuuteen, joten sairauden tulisi helpottua bakteerimäärän vähentyessä (Sheldon ym. 2004). Ensimmäisessä tutkimuksessa määritettiin vastapoikineiden holsteinien kohduista huuhtelulla saatujen *E. coli* -kantojen bakteriofagiherkkyys (Santos ym. 2010). Kahden navetan lietelannasta eristetyn bakteriofagiseoksen todettiin olevan lyyttinen *in vitro* tutkittuihin *E. coli* -kantoihin nähden (Santos ym. 2010). Tämän innoittamana tehtiin parikin tutkimusta lehmällä, joissa ei kuitenkaan voitu toistaa *in vitro* saatuja tuloksia (Machado ym. 2012, Meira ym. 2013). Toisessa näistä tutkimuksista bakteriofagien annostelu jopa lisäsi jälkeisten jäämisen sekä kohtutulehduksen riskiä (Meira ym. 2013). Tutkimuksessa käytettyä bakteriofagivalmistetta ei ollut puhdistettu asianmukaisesti ja se sisälsi valmisteen tuottamisessa lyaattiin jäänyttä endotoksiinia, minkä arvellaan johtaneen kohdun immuunipuolustuksen heikentymiseen ja havaittuihin komplikaatioihin.

Suuria taloudellisia tappioita maailmalla aiheuttavan vasikkaripulin yksi aiheuttaja on enterotoksigeeninen *Escherichia coli* (ETEC). Monet näistä *E. coli* -kannoista ovat mikrobilääkkeille resistenttejä ja siten vaikeahoitoisia. Varhaisessa tutkimuksessa Smith ym. (1987) toteavat, että vasikat voitaisiin parantaa suun kautta annettavalla yksittäisellä 10^5 pfu (plakin muodostava yksikkö, engl. plaque-forming unit) annoksella faagiseosta ja tartuntaa ehkäistä suihkuttamalla vasikoiden tilat samalla valmisteella. Myöhemmässä tutkimuksessa tehokas annos on ollut selvästi suurempi (10^{11} pfu), ja on todettu rektaalisen sekä oraalisen antoreitin olevan tehokkaita vähentämään ETEC-eritystä (Rozema ym. 2009).

Eräässä tutkimuksessa bakteriofagiseosta lisättiin vasikan maidonkorvikkeeseen, jolloin vasikat lopettivat patogeenisen bakteerin erityksen kahdeksan päivää hoidon aloittamisen jälkeen (Waddell ym. 2002). Tässä kokeessa käytetty korvike sisälsi mahahappoja puskuroivaa kalsiumkarbonaattia, joka saattoi parantaa bakteriofagien elinkelpoisuutta

suolistossa. Lyyttisten bakteriofagien annostelua gelatiinikapseleissa on kokeiltu aikuisilla naudoilla (Stanford ym. 2010). Tässä tutkimuksessa valmiste ei vähentänyt ETEC-erityksen määrää, mutta eritysaika väheni keskimäärin 14 päivällä kontrolleihin verrattuna.

4.2 Siipikarja

Salmonella- ja *Campylobacter*-sukujen bakteerit ovat merkittäviä zoonoottisia elintarvikevälikkeiden sairauksien aiheuttajia. WHO:n raportin mukaan bakteeriperäisistä elintarvikevälikkeistä sairauksista yli 80 % johtuu näistä patogeeneistä (FAO/WHO 2009). Ihmisten sairastumiset liitetään usein saastuneeseen siipikarjanlihaan, muniin tai muun elintarvikkeen ristikontaminaatioon näiden kanssa (McCrea ym. 2006). Tuoreessa raportissaan Euroopan elintarvikevirasto EFSA on ilmaissut huolensa mikrobilääkeille resistenttien salmonella- ja kampylobakteerikantojen lisääntymisessä Euroopan unionin alueella (EFSA 2020). Raportin seurantajaksolla 2017–18 etenkin resistenssi ihmisillä salmonellan ja kampylobakteerin aiheuttamien infektioiden hoidossa käytettyä siprofloksasiinia kohtaan oli lisääntynyt. Lisäksi vuonna 2018 raportoitiin ihmisillä yksittäisiä karbapeneemille resistenttejä *Salmonella*-kantoja.

4.2.1 *Salmonella* spp.

Useimmat eristetyistä *Salmonella*-bakteriofageista kuuluu *Caudovirales*-lahkoon ja sen *Myoviridae*-, *Siphoviridae*- ja *Podoviridae*-perheisiin (Ackermann 2007). Yksi tunnetuimmista ryhmän bakteriofageista on Felix O1, joka pystyy infektoimaan lähes kaikkia *Salmonella*-kantoja ja jota voidaan käyttää hyödyksi salmonellabakteerien tunnistamisessa (Kuhn 2007). Salmonellojen tunnistaminen perustuu geenimuokkauksella bakteriofagiin lisättyyn väriä tuottavaan lusiferaasientsyymiin.

Bakteriofagien käyttöä siipikarjan salmonellatartuntojen ehkäisyyn on tutkittu viimeisten vuosikymmenten aikana melko laajasti etenkin *Salmonella enterica* serotyypin Typhimurium ja Enteritidis osalta. Bakteriofagien on osoitettu pystyvän vähentämään huomattavasti - muttei kokonaan poistamaan *Salmonella*-bakteereita eri-ikäisillä broilereilla. Yksi selitys tälle voi olla bakteerin kyky sijoittua solun sisälle, jolloin se on bakteriofagin ulottumattomissa (Atterbury ym. 2007).

Berchierin ym. (1991) tutkimuksessa bakteriofagit vähensivät huomattavasti untuvikkojen kuolleisuutta *Salmonella* Typhimurium -bakteerin aiheuttamaan infektiin. Tutkimuksessa käytetty bakteriofagivalmiste sisälsi yhtä bakteriofagia, mitä annettiin melko korkealla annoksella (yli 10^{10} pfu). Patogeenin määrä väheni hoidon jälkeen, mutta kohosi takaisin nopeasti. Tutkijat epäilevät kokeessa käytetyn korkean annoksen johtaneen ns. lysis from without -ilmiöön, jossa bakteriofagit eivät lisäänty normaalisti bakteereissa replikaation ja bakteerisolun tuhoutumisen kautta vaan havaittu bakteerimäärän pieneneminen johtuisi suuren bakteriofagimäärän yhtäaikaista kiinnittymisestä bakteeriin. Tällöin bakteeri tuhoutuu ilman uusien bakteriofagien syntymistä ja bakteriofagihoidon vaikutusaika jää lyhyeksi (Abedon 2011). Tutkimuksessa osoitettiin myös yksittäisten bakteriofagien käyttämisen johtavan nopeasti resistenttien bakteerikantojen kehittymiseen (Berchieri ym. 1991).

Vuosikymmen myöhemmin tutkittiin ulkokanoilta eristettyjä lyyttisiä bakteriofageja *Salmonella* Enteritidis faagityyppi 4:ää (PT4) vastaan (Fiorentin ym. 2005). Yhden vuorokauden ikäiset untuvikot infektoitiin PT4:llä, ja viikon ikäisinä untuvikoille annettiin suun kautta kolmen bakteriofagiseosta, jossa kutakin bakteriofagia oli erittäin korkea annos (10^{11} pfu). Näytteistä havaittiin *Salmonella* Enteritidis PT4:n väheneminen jopa 25 päivän ajan hoidon jälkeen. Tutkimuksessa käytettiin edellisestä poiketen useamman bakteriofagin hoitovalmisteen sekä korkean annoksen yhdistelmää estämään resistenttien bakteerien kehittymistä.

Ennaltaehkäisevää tutkimusta salmonellan torjumisesta on myös tehty (Borie ym. 2008). Kolmen bakteriofagin seoksen tehokkuutta tutkittiin annostelemalla seos joko eläimiä suihkuttamalla tai sekoittamalla juomaveteen vuorokautta ennen kanojen altistusta *Salmonella* Enteritidis -bakteerille annoksella 10^6 cfu (pesäkkeen muodostava yksikkö, engl. colony-forming unit). Arvioimalla annettujen bakteriofagien ja kanassa olevan patogeenin määrän suhdetta voidaan laskea infektion MOI- eli monikerta-arvo. Tässä MOI-arvoksi saatiin 10^3 eli yhtä bakteeria kohden annosteltiin noin 1000 bakteriofagia. Kokeen jälkeen kanat lopetettiin ja bakteriofageja löydettiin kymmenen päivän kuluttua kokeen aloittamisesta kanan suolistosta sekä muista elimistä. Molemmilla tutkituilla antotavoilla salmonellan määrä saatiin vähentymään. Myöhemmin samat tutkijat osoittivat, että faagiterapia yhdistettynä kompetitiiviseen eksklusioon, jossa vastakuoriutuneet untuvikot

altistetaan terveiden aikuisten suolimikrobistolle, vähentää *Salmonella* Enteritidis -bakteeria tehokkaammin kuin kumpikin hoitomuoto erikseen (Borie ym. 2009).

Yksittäisen hoitokerran teho *Salmonella*-infektioon voi olla lyhyt. Suun kautta annettu yksittäinen usean bakteriofagin valmiste vähentää tehokkaasti *Salmonella* Enteritidis -bakteerin määrää 48 tunnin ajan ilman pitkäaikaista suojaa (Andreatti Filho ym. 2007).

Myöhemmin on tutkittu myös useamman hoitokerran malleja. Ahmadi ym. (2016) tutki sekä ennaltaehkäisevää että terapeutista mallia, jossa bakteriofagia annetaan kerran päivässä kolmen päivän ajan ennen altistusta tai altistuksen jälkeen. Viiriäisillä toteutetussa tutkimuksessa seitsemän päivän kuluttua altistuksesta *Salmonella* Enteritidis -bakteeria löytyi suolistosta 20 %:lla eläimistä profylaksiaryhmässä sekä kaikilla hoitoryhmässä olleilta. Mielenkiintoista on, että tutkittu bakteriofagi näytti persistoivan suolistossa eläimillä, joille ei tehty bakteerialtistusta. Tämä voi johtua siitä, että bakteriofagilla on vaihtoehtoisia isäntiä tai bakteriofagi voi pysyä inaktiivisessa muodossa suolistossa. Samansuuntaisia tuloksia persistoinnista on saatu myös toisessa tutkimuksessa, mikä on lupaavaa ajatellen bakteriofagien ennaltaehkäisevää käyttöä ajatellen (Verthe ym. 2004). Hiljattain on kokeiltu myös viiden hoitokerran mallia (Nabil ym. 2018). Tässä mallissa nähtiin kiihtyvä salmonellamäärän vähenemä. Kolmen päivän kohdalla vähenemä oli vielä pientä, viiden päivän jälkeen selvästi suurempi ja seitsemänneistä päivästä kokeen loppuun (15 päivää) asti salmonellaa ei enää havaittu.

4.2.2 *Campylobacter jejuni*

Suuri osa tunnetuista kampylobakteereita infektoivista bakteriofageista kuuluu myös *Caudovirales*-lahkoon ja *Myoviridae*-perheeseen (Connerton ym. 2008). Kampylobakteerien bakteriofagit voidaan luokitella käyttämällä genomia ja pään kokoa sekä alttiutta genomia pilkkoutumiseen HhaI-restriktioentsyymillä (Sails ym. 1998, Hansen ym. 2007). Sails ym. (1998) luokittelee kampylobakteerien faagit ryhmiin I, II ja III.

Bakteriofagien käyttöä kartoitettiin broilereilla *Campylobacter jejuni* -bakteerin torjunnassa sekä terapeuttisena että ennaltaehkäisevänä vaihtoehtona (Wagenaar ym. 2005).

Bakteriofagina tutkimuksessa käytettiin kahta ryhmään III kuuluvaa faagia sekä yksittäin että yhdessä. Bakteriofagihoito vähensi bakteeri eritystä ulosteeseen sekä terapeutisesti että

profylaktisesti annettuna. Saavutettu hoitotulos oli kuitenkin tilapäinen, eikä bakteriofagihoito hävittänyt tai ehkäissyt bakteeri-infektiota pysyvästi.

Samansuuntaisiin tuloksiin päädyttiin aidoissa broilerinkasvattamoissa tehdyssä tutkimuksessa (Kittler ym. 2013). Neljän ryhmään III kuuluvan bakteriofagin seos annosteltiin broilerien juomaveteen kolmessa kasvattamossa. Valitut bakteriofagit olivat tehokkaita vain yhdessä kasvattamossa, jossa kampylobakteerien määrä ulosteessa väheni aluksi alle mittausrajan ja ollen vielä teurastuspäivänä merkittävästi alentunut kontrolliin verrattuna. Kahdessa muussa kasvattamossa bakteriofageilla hoidetuilla ryhmillä ei ollut eroa kontrolleihin nähden. Käytettyjä bakteriofageja ei eristetty tutkimuksessa mukana olleilta tiloilta eikä myöskään valikoitu tiloilla olevien bakteerikantojen mukaan, mikä saattaa selittää tuloksia.

Kampylobakteerin torjunta perinteisin keinoin on erittäin hankalaa: toimivaa rokotetta ei ole ja hyvällä tautisuojauskella saavutetaan vain osittainen teho (Ushanov ym. 2020).

Kampylobakteeri ei yleensä aiheuta broilereille näkyviä oireita, ja ympäristöstä kulkeutunut patogeeni pääsee siten yleensä vapaasti leviämään kasvattamoilla (Ruokavirasto 2019c).

Kampylobakteeriposiitivissa broilerikasvattamoissa on yleensä lukuisia *C. jejuni* -kantoja ja todennäköisesti yllä mainituissa tutkimuksissa havaittu resistenssin kehittyminen ei ole aitoa, vaan yksikertaisesti bakteriofagilla nujerrettu kanta häviää suolistosta ja tilalle tulee toinen (Ushanov ym. 2020). *C. jejuni* on geneettisesti hyvin monimuotoinen bakteeri, mikä vaikeuttaa bakteriofagihoidon toteuttamista. Parhaaseen hoitotulokseen todennäköisesti pääsisi käyttämällä kyseiseltä kasvattamolta eristettyjä bakteriofagikantoja yhdistettynä kunnolliseen tautisuojaukseen (Ushanov ym. 2020).

4.3 Sika

4.3.1 *Staphylococcus aureus*

Tuotantoeläimiin liitetty metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) ja erityisesti sen CC398-tyyppi on ollut esillä zoonoottisena taudinaiheuttajana vuosituhatien alkupuolelta lähtien. CC398-tyyppiä löydettiin ensimmäisenä sikatilalta Euroopasta ja myöhemmin samaa MRSA-tyyppiä on eristetty myös naudalta, hevoselta ja siipikarjalta (Larsen ym. 2015). Sikaa kuitenkin pidetään CC398-tyypin pääasiallisena reservuaarina

(Grøntvedt ym. 2016). Tanskassa on viime vuosina liitetty jopa 40 % uusista MRSA-tapauksista CC398-tyyppiin. Suomessa vastaava luku on ollut viime vuosina nousussa ja vuonna 2019 kaikista MRSA-ilmoituksista 6,8 % liittyi CC398-tyyppiin (THL 2020). Patogeeni on yleistynyt nopeasti sikaloissa: esimerkiksi Tanskassa vuonna 2016 satunnaisesti valituista sikatiloista 88 % oli positiivinen LA-MRSA:n suhteen (Sørensen ym. 2018). LA-MRSA on todennäköisesti yleinen myös suomalaisissa sikaloissa, 2016-2017 kerätyistä sikaerien teurastamonäytteistä positiivisia oli 77 % (Evira 2018). Erityisen riskin LA-MRSA muodostaa tuotantoeläinten parissa työskenteleville ja heidän perheenjäsenilleen (Larsen ym. 2015). Toisaalta CC398-kantaa on eristetty yhä enemmän ihmisiltä, joilla ei ole ollut kontaktia tuotantoeläimiin (Grøntvedt ym. 2016).

Nykyisin sikaloissa pyritään vähentämään tautipainetta esimerkiksi ylläpitämällä eläinten luonnollista vastustuskykyä, huomioimalla ikäryhmien erityistarpeet, asianmukaisilla tautisuluilla ja osastokohtaisilla suojavaatteilla (Evira 2015). Mikrobilääkkeiden käyttö tulisi pitää mahdollisimman alhaisena, koska se valikoi resistenttejä bakteereita. Bakteriofagit voisivat spesifisyytensä vuoksi olla MRSA:n vastustamiseen hyvä lisä olemassa oleville keinoille. Ainakin kahdessa julkaistussa tutkimuksessa on pystytty eristämään lyyttisiä bakteriofageja tutkituille MRSA-kannoille *in vitro* (Verstappen ym. 2016, Honegger ym. 2020). Bakteriofageja ei kuitenkaan ole saatu näissä tutkimuksissa toimimaan eläimessä toivotulla tavalla. Toisessa näistä tutkimuksista kokeissa käytettyjä bakteriofageja ei tyypitetty kunnolla tutkittavan MRSA-kannan suhteen, mikä johti bakteriofagiseoksen vääristyneeseen koostumukseen ja todennäköisesti liian alhaiseen bakteriofagipitoisuuteen eläimessä ollakseen tehokas (Verstappen ym. 2016). Tutkijat toteavatkin aiheen vaativan suurempaa ymmärrystä MRSA:n ja sen bakteriofagien vuorovaikutuksista *in vitro* -malleissa ennen eläimessä tehtävää tutkimusta.

4.3.2 *Escherichia coli*

Enterotoksigeeninen *Escherichia coli* (ETEC) on yksi mahdollinen vieroitusripulin aiheuttaja porsaan vastustuskyvyn heikentyessä vieroituksen yhteydessä (Rhouma ym. 2017).

Sairauteen liittyy lisääntynyt porsaskuolleisuus ja ripulista selviytyneillä kasvun hidastuminen. Vieroituksen jälkeinen stressi vaikuttaa suoliston toimintaan ja mahdollistaa patogeenien lisääntymisen. Sairauden ennaltaehkäisy perustuu ensisijaisesti asianmukaisiin

olosuhteisiin vieroituksen aikana (Le Devendec ym. 2018). Toimenpiteet stressin vähentämiseksi nostavat yleensä tuotantokustannuksia ja sairautta on etenkin ennen hoidettu rutiinisti Euroopan unionin alueella mikrobilääkkeillä, kuten ihmisten reservimikrobilääkkeisiin kuuluvalla kolistiinilla (Rhouma ym. 2016). Suomessa ei kolistiinia käytetä tuotantoeläimillä (Ruokavirasto 2020). Tälle mikrobilääkkeelle on viime vuosina nähty kiihtyvässä määrin resistenssiä sioissa, muissa eläimissä ja ihmisessä (Gharaibeh ja Shatnawi 2019). Kolistiinin käyttö onkin vähentynyt mikrobilääkeresistenssin takia vieroitusripulin hoidossa (Rhouma ym. 2017). Toinen yleisesti, myös Suomessa käytössä ollut porsasripulin hoitoon tarkoitettu lääkeaine on sinkkioksidi. Bakterin vastustuskyky sinkkioksidiin on yhdistetty kulkeutuvan yhdessä mikrobilääkeresistenssin kanssa ja sinkkioksidivalmisteiden myyntiluvat on peruttu EU:n alueella siirtymäajan loppuessa vuonna 2022 (European Medicines Agency 2017).

Mahdollisuus perinteisesti porsasripuliin käytettyjen hoitojen hyödyntämiseen on vähentynyt, mikä on johtanut vaihtoehtoisten ratkaisuiden etsimiseen. Bakteriofagihoidolla on saatu rohkaisevia tuloksia porsailla tehdyissä tutkimuksissa (Jamalludeen ym. 2009, Kim ym. 2017, Lee ym. 2017). Bakteriofagin on osoitettu parantavan vieroitettujen porsaiden kasvua ja inhihoivan patogeenin kolonisaatiota kokeellisen ETEC-altistuksen jälkeen (Lee ym. 2017). Tässä tutkimuksessa porsaat altistettiin yhdelle ETEC-kannalle ja käytetty yhden bakteriofagin valmiste oli todettu *in vitro* lyyttiseksi juuri tälle bakteerille. Kim ym. (2017) tutkimuksessa olosuhteet olivat enemmän oikeaa tuotantotilannetta vastaavat eikä bakteeriantistusta tässä tehty, vaan tutkittiin bakteriofagiseoksen vaikutusta vieroitettujen porsaiden suoliston rakenteeseen sekä suoliston patogeenien esiintyvyyteen. Bakteriofageilla hoidetussa ryhmässä ohutsuolen värekarvat olivat pitempiä ja patogeenien määrä vähäisempi. Suoliston värekarvojen lyhentyminen on aiemmin yhdistetty vieroitusripuliin (Nabuurs ym. 1993).

4.4 Kalat

4.4.1 Flavobakteerit

Flavobakteerit (*Flavobacterium columnare* ja *Flavobacterium psychrophilum*) ovat kirjolohenviljelyssä merkittävimpiä taloudellisia tappioita aiheuttavia patogeeneja (Loch ja

Faisal 2015). *F. psychrophilum* aiheuttaa kylmän veden taudiksi kutsuttua yleisinfektiota sekä nuoremmilla yksilöillä pikkupoikassyndroomaa, ja *F. columnare* lämpimän veden aikaan kolumnaaritautia, joka oireilee kidus- tai yleistulehduksena (Loch ja Faisal 2015).

Taudinpurkaukset vaativat toistuvia mikrobilääkehoitoja, eikä tehokasta rokotetta ole saatavilla (Gómez ym. 2014). Flavobakteereilla on havaittu lisääntyntä mikrobilääkeresistenssiä ja bakteriofageja on ehdotettu vaihtoehtoiseksi hoidoksi (Stenholm ym. 2008).

Kolumnaaritauti on taloudellisesti erittäin merkittävä, pikkupoikasten kuolleisuus taudinpurkauksessa voi olla jopa 100 % (Suomalainen ym. 2005). Mikrobilääkkeitä käytetään kalankasvatuslaitoksilla estämään poikasten massakuolemia. Tehokkaasta hoidosta huolimatta taudinpurkauksia voi olla jatkuvasti kesäisin, mikä johtaa runsaaseen mikrobilääkkeiden käyttöön (Pulkkinen ym. 2010). Kolumnaaritauti on hyvä kandidaatti bakteriofagihoidolle, koska tauti ilmenee lähinnä ulkoisesti ja bakteeri leviää veden välityksellä (Laanto ym. 2015).

Laanto ym. (2011) eristivät 49 flavobakteereita infektoivaa bakteriofagia suomalaisista vesistöistä. Kaikki eristetyt bakteriofagit olivat hännällisiä ja kuuluivat *Myoviridae*-, *Podoviridae*- ja *Siphoviridae*-perheisiin. Tutkimuksessa osoitettiin joidenkin eristetyistä bakteriofageista pystyvän estämään *F. columnare* -bakteerin kasvua *in vitro*. Kaikkien *F. columnare* -faagien havaittiin olevan hyvin isäntäspesifisiä. Myöhemmin yhtä tässä tutkimuksessa kalanviljelylaitokselta eristettyä bakteriofagia (FCL-2) tutkittiin tarkemmin (Laanto ym. 2015). Laboratorio-olosuhteissa selvitettiin bakteriofagihoidon tehokkuutta kolumnaaritaudin estämiseen seeprakaloilla ja kirjolohilla. Tutkimuksessa käytettiin yhtä *F. columnare* -kantaa ja FCL-2-faagia suljetussa altaassa sekä enemmän todellista ympäristöä muistuttavassa läpivirtausakvaariossa. Bakteriofagin todettiin tässä koejärjestelyssä toimivan kolumnaaritaudin kontrolloimiseen. Kuolleisuus kirjolohilla laski viidesosaan, kun taas kaikki seeprakalat menehtyivät ilman bakteriofagia ja faagin kanssa kaikki selvisivät. Tulosten soveltamisessa käytäntöön liittyy ongelmia, koska flavobakteerien populaatorakenne viljelylaitoksilla on monimutkainen ja niissä esiintyy useita *F. columnare* -kantoja (Suomalainen ym. 2006). Haasteita tuovat myös bakteerin alhainen jakautumisaktiivisuus sekä mahdollisen hoidon tuntematon MOI-arvo (Zhang ym. 2014).

Hiljattain sama suomalainen tutkimusryhmä vei aiemmin eristetyn bakteriofagin (FCL-2) oikeaan kalakasvatamoon tutkiakseen faagin käyttäytymistä kiertovesikasvatuksessa (Almeida ym. 2019). Tässä tutkimuksessa FCL-2-faagia annosteltiin kirjolohien kasvatusaltaisiin ja bakteriofagien määrää seurattiin vedestä, kalojen limakalvoilta sekä kiertovesijärjestelmän eri osissa. Bakteriofagia löydettiin annostelun jälkeen 14-21 päivän ajan riippuen tarkasteltavasta kohteesta. Johtopäätöksenä tutkimuksessa oli, että kerran lisätty bakteriofagi säilyy huomattavan pitkän ajan kiertovesijärjestelmässä eivätkä järjestelmän osat vaurioita bakteriofagia. Lisäksi vedenlaatu, kalakuolleisuus sekä kalojen syöminen pysyivät muuttumattomina. Kyseisen bakteriofagin osalta tutkimus on edennyt johdonmukaisesti faagin tehon osoittamisessa laboratorio-oloista kohti käytännön sovelluksia. Flavobakteerien bakteriofagitutkimusta tehdään edelleen Jyväskylän yliopistossa ja kaiken onnistuessa tämä voisi olla eläinlääketieteessä ensimmäisiä bakteriofagien käyttökohteita Suomessa.

4.4.2 *Aeromonas salmonicida*

Aeromonas salmonicida alalaji *salmonicida* on tärkeä taloudellisia tappioita aiheuttava etenkin lohikalojen patogeeni, jota esiintyy sekä makeassa että suolaisessa vedessä (Austin ja Austin 2016). Bakteri leviää ihohaavaumien ja kidusten kautta aiheuttaen akuutin tai kroonisen hemorragisen septikemian, jota kutsutaan paisetaudiksi eli furunkuloosiksi (Ringo ym. 2004). Paisetaudilla on kaksi taudinkuvaa: kuolleisuuden nopeaa kasvua aiheuttava akuutti muoto on yleisempi, kun taas kroonisessa taudissa kalan ihoon muodostuu paisemaisia furunkkeleita (Austin ja Austin 2016). Tautiin on kehitetty useita rokotteita, joiden teho on ollut vaihtelevaa ja akuuteissa taudinpurkauksissa on edelleen turvauduttava mikrobilääkkeiden käyttöön (Braden ym. 2019). Mikrobilääkeresistenssi on bakteerilla yleistä: 41,9 % testatuista *A. salmonicida* -kannoista oli resistentti yhdelle tai useammalle testatulle mikrobilääkkeelle (Ortega ym. 2006).

Usean bakteriofagin tiedetään pystyvän infektoimaan *A. salmonicida* -bakteeria ja näistä on tehty jonkin verran tutkimusta vaihtelevin tuloksin. Kolmen bakteriofagin yhdistelmä hidasti taudin puhkeamista, mutta hoito ei vaikuttanut kalojen kokonaiskuolleisuuteen (Verner-Jeffreys ym. 2007). Tutkimuksessa löydettiin lisäksi resistenttejä bakteereita kuolleilta kaloilta ja syntyneen resistenssin ajateltiin vaikuttaneen tuloksiin. Paremman tulokseen

päästiin, hieman ristiriitaisesti, yhden lyyttisen bakteriofagin hoidolla. Tällöin *A. salmonicida* -bakteerilla infektoidujen kirjolohien kuolleisuus pieneni selvästi (Kim ym. 2015). Tässä tutkimuksessa hyvää tulosta saattoi selittää tarkemmin tyypitetty bakteriofagi, mikä lupaavaa jatkoa ajatellen. Yhden bakteriofagin käyttäminen kuitenkin aiheuttaa resistenssin muodostumiseen ajan kuluessa. Resistenssin muodostuminen voi kuitenkin olla kalalle eduksi, koska resistentit bakteerit menettivät virulenssiaan ja jakautuivat hitaammin (Imbeault ym. 2006). Lisäksi osoitettiin, että yhdelle bakteriofagille resistentti *A. salmonicida* voidaan infektoida toisella bakteriofagilla.

4.4.3 *Vibrio anguillarum*

Vibriot ovat geneettisesti ja metabolisesti laaja ja monimuotoinen bakteeriperhe, jota tavataan vesiympäristöissä kaikkialla maailmassa. Useat vibriot ovat patogeenisiä sekä ihmisille että eläimille. Yksi tärkeimmistä vibrioista eläinlääketieteessä on vibrioosia aiheuttava *Vibrio anguillarum*. Tämä bakteeri kykenee infektoimaan lukuisia kaloja ja äyriäisiä aiheuttaen merkittävää kuolleisuutta ja johtaa näin ollen suuriin taloudellisiin menetyksiin (Frans ym. 2011). Rokotteilla voidaan tehokkaasti kontrolloida vibrioosia aikuisilla kaloilla, mutta kalanpoikaset ovat erityisen alttiita sille heti kuoriutumisen jälkeen (Rorbo ym. 2018). Poikasten immuunijärjestelmä ei ole vielä tarpeeksi kehittynyt, jotta rokotteesta olisi hyötyä. Myös vibrioosia on ennaltaehkäisty ja hoidettu mikrobilääkkeillä, mikä on johtanut resistenttien bakteerikantojen kehittymiseen (Rorbo ym. 2018).

Bakteriofagien käyttö vibrioita vastaan on kiinnostaneet tutkijoita suuresti vibrioiden levinneisyyden, patogeenisyyden ja taloudellisten seikkojen vuoksi. Tutkimuksissa on järjestään saatu tuloksia, joissa kuolleisuus on pienentynyt: Esimerkiksi vuonna 2011 julkaistiin tutkimus, jossa *V. anguillarum* -faagilla (CHOED) hoidetut lohet selvisivät kaikki bakteeritartunnasta (Higuera ym. 2013). Kontrolleilla kuolleisuus oli 60 %.

4.5 Lemmikkieläimet

4.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteriofagien käytöstä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin aiheuttamaan ulkokorvatulehdukseen löytyy kirjallisuudesta joitakin julkaisuja. Ensimmäinen aiheesta

tehty julkaisu on tapausselostus koiran kroonisesta ulkokorvantulehduksesta (Marza ym. 2006). Koira oli atopiaa sekä kroonista, bilateraalista ulkokorvantulehdusta sairastava 5-vuotias bernhardinkoira. Korvia oli hoidettu useilla topikaalisilla sekä systeemisillä antibiooteilla. Ennen bakteriofagihoitoa molemmat korvat punoittivat ja niissä oli runsasta eritystä. Hoito toteutettiin annostelemalla bakteriofagivalmistetta topikaalisesti korviin. Vuorokauden kuluttua bakteriofagien annosta korvat olivat kliinisesti paremmat ja korvanäytteen perusteella bakteriofagit olivat lisääntyneet korvassa. Seurannassa korvien kunto vaihteli ja korvista löydettiin *P. aeruginosa* -bakteeria vielä useiden viikkojen ajan. Yhdeksän kuukauden kohdalla korvat olivat silmämääräisesti puhtaat ja eikä *P. aeruginosa* -bakteeria enää löytynyt viljelyssä.

Muöhemmin bakteriofagien käyttöä *P. aeruginosa* -bakteerin aiheuttamaan krooniseen ulkokorvantulehdukseen tutkittiin kymmenen koiran ryhmällä (Hawkins ym. 2010). Jokaista koira oli hoidettu vähintään kolmella antibioottikuurilla ja koirien korvat oli puhdistettu säännöllisesti. Korvat arvioitiin kliinisesti (korvakäytävän ahtaus, punoitus, eritteen määrä ja tyyppi, haavaumat sekä haju), tehtiin korvakäytävän bakteeriviljely ja tutkittiin bakteriofagien määrä sekä ennen hoitoa että hoidon jälkeen 48 tunnin kuluttua. Hoidossa käytettiin kuuden bakteriofagin seosta, joka sisälsi 10⁵ pfu:ta kutakin bakteriofagia. Valmisteen kerrotaan tehoavan *in vitro* 90 %:iin koiran *P. aeruginosa* -kannoista. Valmistetta annosteltiin jälleen topikaalisesti korvaan. Korvatutkimuksessa 48 tuntia hoidon jälkeen todettiin, käyttämällä yllä mainittuja kriteereitä, korvat näyttivät kliinisesti selvästi paremmalta ja korvanäytteen bakteerimäärä oli laskenut keskimäärin 67 %:lla sekä bakteriofagien määrä noussut satakertaisesti. 18 kuukauden seurantajaksolla tutkimukseen osallistuneista kymmenestä koirasta kolmen koiran korvatulehdus oli kokonaan parantunut, kolmen koiran kohdalla korvatulehduksen *P. aeruginosa* -komponentti saatiin hoidettua pois, kaksi koirista jouduttiin lopettamaan muiden syiden takia ja kahden koiran osalta tutkimus jäi seurantajaksolla kesken. Loppujen kolmen koiran kohdalla korvasta ei enää seurantajaksolla eristetty *P. aeruginosa* -bakteeria, mutta korvatulehdus jatkui korvissa olleiden muiden patogeenien takia. Koirilla ei huomattu hoitoon liittyviä haittavaikutuksia (Hawkins ym. 2010).

Kummatkin julkaisut sisältävät vain vähän kliinisiä tietoja koirista. Tapausselostuksessa hoidossa käytettyjä bakteriofageja ei kerrota, eikä myöskään tuoda esille onko koiran

muussa hoidossa tapahtunut muutoksia. Jälkimmäisessä tutkimuksessa bakteriofagihoitoa ei yksilöity kyseisen koiran patogeeninkannan mukaan vaan samaa valmistetta käytettiin kaikilla koirilla. Olisi kuitenkin mielenkiintoista verrata tutkimuksessa saatuja tuloksia jokaiselle koiralle erikseen räätälöityyn, yksilölliseen hoitoon, jossa käytettäisiin patogeeneille *in vitro* tehokkaimmiksi havaittuja bakteriofageja.

4.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli on yleisin virtsatieinfektion aiheuttaja sekä koiralla että kissalla (Ball ym. 2008, Teichmann-Knorrn ym. 2018). Virtsatietulehduksia aiheuttavilla uropatogeenisilla *E. coli* -kannoilla (UPEC) on virtsateiden infektoimista ja siellä persistointia helpottavia virulenssitekijöitä (Tramuta ym. 2011). Mikrobilääkeresistenssin yleistyessä myös eläinten uropatogeenisten kolibakteerien joukossa myös virtsatietulehdusten hoidosta on tullut vaikeampaa (Chang ym. 2015).

Bakteriofagien käytöstä koiran ja kissan virtsatietulehdusten hoidossa löytyy muutama tutkimus. Bakteriofagien lyyttistä tehoa on tutkittu *in vitro* UPEC-kantoihin (Freitag ym. 2008). Tutkimukseen bakteriofagit kerättiin jätevedestä ja eristettiin käyttämällä satunnaisesti valittua osaa tutkimuksen *E. coli* -kannoista. Yhteensä tutkimuksessa oli mukana 40 bakteriofagia ja 53 uropatogeenistä koiran ja kissan *E. coli* -kanta. Lähes kaikkiin (94 %) UPEC-kantoihin löytyi yksi tai useampi lyyttinen bakteriofagi. Viisi laajakirjoisinta bakteriofagia tyypitettiin tarkemmin ja ne kaikki kuuluivat *Myoviridae*-perheeseen. Myöhemmin on esitetty bakteriofagien tehoavan mikrobilääkeresistentteihin *E. coli* -kantoihin sekä pystyvän hajottamaan uropatogeenisen *E. coli* -bakteerin muodostamia biofilmejä (Chibeu ym. 2012, Green ym. 2017).

Virtsatietulehdusten osalta tutkimus on vasta alkuvaiheessa ja nyt on osoitettu lähinnä bakteriofagien *in vitro* tehokkuus. Lisätutkimusta aiheesta tehdessä tulee miettiä myös bakteriofagien antoreittiä. Enteraalisesti annettavat bakteriofagit imeytyvät ja jakautuvat elimistössä verrattaen huonosti esimerkiksi verrattuna injektioihin (Dąbrowska 2019). Todennäköisesti luotettavimman tuloksen bakteriofagien tehosta virtsatietulehduksiin saadaan annostelemalla valmiste katetrilla suoraan rakkoon, kuten tehtiin kliinisessä kokeessa ihmisillä (Leitner ym. 2017).

5 POHDINTA

Tehty kirjallisuuskatsaus näyttää tutkimuksen bakteriofagien hyödyntämisestä eläinten infektioiden hoidossa olevan melko niukkaa ja tuloksiltaan vaihtelevaa. Parhaiten bakteriofagihoito on onnistunut, kun käytetyt bakteriofagit ovat laadukkaasti karakterisoitu ja tyypitetty tehoaviksi tutkittuihin bakteereihin (Hyman 2019). Eläimillä tehty bakteriofagitutkimus on keskittynyt pääasiallisesti tuotantoeläimiin ja lemmikeistä on julkaisuja tehty toistaiseksi vain muutama. Tutkimuksissa on pystytty eristämään suuri joukko eläinten taudinaiheuttajabakteereita *in vitro* tuhoavia bakteriofageja ja näitä tuloksia on saatu toistettua myös eläimissä (Gigante ja Atterbury 2019).

Bakteriofageilla on useita hyödyllisiä ominaisuuksia hoidon toteuttamisen kannalta. Bakteriofagit tuhoavat bakteerisoluja hyvin spesifisesti, jolloin asianmukaisesti hoitoon valitut faagit eivät aiheuta muutoksia elimistön normaalissa mikrobiomissa (Kortright ym. 2019). Ideaalitulanteessa bakteriofagihoidossa faagi lisääntyy infektiopaikalla ja isäntäbakteerin hävitessä myös bakteriofagi häviää (Moelling ym. 2018). Käytännön sovellusten kannalta mikrobilääkkeiden ja bakteriofagien synergiaedut ovat merkittäviä: bakteriofageilla voidaan herkistää bakteereita uudelleen mikrobilääkkeille ja mikrobilääkkeillä taas muokata bakteriofagiresistenssiä pois (Tagliaferri ym. 2019). Yhtenä tärkeimmistä hyödyistä on turvallisuus: bakteriofagien itsessään ei tutkimuksissa ole havaittu aiheuttavan haittavaikutuksia (Kakasis ja Panitsa 2019, Principi ym. 2019). Kirjallisuuskatsauksessa ainoa esiin tullut komplikaatio liittyi bakteriofagivalmisteen epäpuhtauksiin (Meira ym. 2013).

Bakteriofagien hyödyntämiseen liittyy runsaasti tietämättömyyttä faagien käyttäytymisestä. Bakteriofagien optimaalisesta annostelusta on hyvin vähän tietoa (Patey ym. 2018). Enteraalisella annostuksella bakteriofagien pitoisuus kudoksissa näyttäisi jäävän melko alhaiseksi (Dąbrowska 2019). Suurempia eläinryhmiä hoidettaessa bakteriofagin annostelun tulee olla käytännöllistä sekä tehokasta. Helppo tapa tähän olisi annostelu suun kautta, joko veden tai rehun mukana. Tällöin bakteriofagien heikko kulkeutuminen suolistosta muualle elimistöön ja ylipäättänsä selviytyminen maha-suolikanavan olosuhteissa voivat aiheuttaa ongelmia hoidon käytännön toteuttamiseen.

Mikrobilääkeresistenssin noustua ongelmaksi on hyvä kysyä voiko sama tapahtua myös bakteriofageille. Tähän ei ole varmaa vastausta. Tiedetään, että bakteripopulaatioon aiheutettu valintapaine kehittää resistenttejä bakteereita oli paineen aiheuttajana sitten mikrobilääke tai bakteriofagi (Chee-Sanford ym. 2009). On toisaalta arveltu, että jokaiselle bakteerille löytyy ympäristöstä sitä infektoimaan kykenevä bakteriofagi (Skurnik ja Kiljunen 2016). Valmisteet voivat sisältää useita bakteriofageja, mikä vähentää mahdollisuutta resistenttien kantojen muodostumiselle (Nikolich ja Filippov 2020). Mielenkiintoista on myös useassa tutkimuksessa havaittu faagiresistentteihin bakteereihin liitetty ns. fitness cost eli resistenssin muodostavien bakteereiden pienentynyt virulenssi (Tagliaferri ym. 2019). Tällöin bakteriofagihoidon mukanaan tuoman valintapaineen poistuttua on nähty resistenttien bakteerikantojen häviävän melko nopeasti eläimestä (Principi ym. 2019). Kuitenkaan ei tiedetä, mihin suuntaan laajamittainen bakteriofagien käyttö ajaisi bakteereiden evoluutiota. Tulevaisuudessa geenimuokattujen bakteriofagien käytön arvioidaan yleistyvän ja muuttavan huomattavasti bakteriofagihoidon toteutusta (Nikolich ja Filippov 2020). Bakteerit ja bakteriofagit ovat miljoonien vuosien kuluessa sopeutuneet elämään rinnakkain toistensa sekä muiden eliöiden kanssa (Hampton ym. 2020). Ennen muokattujen bakteriofagien käyttöä tulisi miettiä miten muokattujen faagien mukanaan tuomat uudet geneettiset ominaisuudet vaikuttavat ympäristöömme.

Resistenssin ohella toinen bakteriofagihoidon haaste on faagien herättämän elimistön immuunivasteen toiminta (Krut ja Bekeredjian-Ding 2018). Tässä bakteriofagien voidaan ajatella olevan kuin rokotteita: Rokotteen tarkoituksena on tehostaa elimistön puolustusvastetta rokotteessa oleville antigeeneille. Bakteriofagit voivat toimia samoin, jolloin toistuvia antokertoja vaativissa tilanteissa elimistön immuunivaste voi herkistyä hoidossa käytetylle bakteriofagille ja seuraavan kerran hoitovaste voi olla täysin erilainen (Skurnik ja Kiljunen 2016).

Bakteeri-infektiot ovat merkittävä eläinten hyvinvointia ja eläimistä saatavan ruuan turvallisuutta uhkaava tekijä (Gutiérrez ym. 2019). Näiden takaaminen vaatii eläinten infektioiden asianmukaista hoitamista. Mikroilääkkeet ovat olleet merkittävässä roolissa eläinten bakteerisairauksien hoidossa aina penisilliinin keksimisestä saakka. Olemme kuitenkin tulleet tilanteeseen, jossa mikroilääkkeet menettävät tehoaan bakteerien kehitettyä resistenssiä useille lääkeaineille. Bakteriofagit tuskin koskaan syrjäyttävät

mikrobilääkkeitä, mutta niiden käytöllä voi olla mahdollista tukea mikrobilääkkeiden vastuullisen käytön jatkamista sekä olla osana mikrobilääkeresistenttien infektioiden hoitoa. Tarvitaan kuitenkin lisää laadukasta tutkimusta selvittämään bakteriofagien, bakteerien ja eläimien välisiä vuorovaikutuksia, ennen kuin voidaan varmuudella sanoa, ovatko bakteriofagit käyttökelpoisia infektioiden hoidossa.

6 LÄHDELUETTELO

Abedon ST. Lysis from without. *Bacteriophage* 2011, 1: 46-49.

Ackermann HW. Salmonella phages examined in the electron microscope. *Methods Mol Biol* 2007, 394: 213-234.

Almeida GMF, Mäkelä K, Laanto E, Pulkkinen J, Vielma J, Sundberg LR. The Fate of Bacteriophages in Recirculating Aquaculture Systems (RAS)-Towards Developing Phage Therapy for RAS. *Antibiotics (Basel)* 2019, 8: 192. doi: 10.3390/antibiotics8040192.

Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. *Poult Sci* 2007, 86: 1904-1909.

Atterbury RJ, Van Bergen MA, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA. Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 4543-4549.

Austin B, Austin DA. *Aeromonadaceae Representative (Aeromonas salmonicida)*. Teoksessa: Austin,B, Austin,DA (toim.) *Bacterial Fish Pathogens*. Springer, Cham, 2016:

Ball KR, Rubin JE, Chirino-Trejo M, Dowling PM. Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. *Can Vet J* 2008, 49: 985-990.

Berchieri A,Jr, Lovell MA, Barrow PA. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* 1991, 142: 541-549.

Berry EM, Dernini S, Burlingame B, Meybeck A, Conforti P. Food security and sustainability: can one exist without the other? *Public Health Nutr* 2015, 18: 2293-2302.

Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 2013, 493: 429-432.

Borie C, Albala I, Sanchez P, Sanchez ML, Ramirez S, Navarro C, Morales MA, Retamales AJ, Robeson J. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Dis* 2008, 52: 64-67.

Borie C, Sanchez ML, Navarro C, Ramirez S, Morales MA, Retamales J, Robeson J. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Avian Dis* 2009, 53: 250-254.

Braden LM, Whyte SK, Brown ABJ, Iderstine CV, Letendre C, Groman D, Lewis J, Purcell SL, Hori T, Fast MD. Vaccine-Induced Protection Against Furunculosis Involves Pre-emptive Priming of Humoral Immunity in Arctic Charr. *Frontiers in Immunology* 2019, 10: 120.

Cenens W, Makumi A, Mebrhatu MT, Lavigne R, Aertsen A. Phage-host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. *Bacteriophage* 2013, 3: e25029.

- Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 2013, 8: 769-783.
- Chang SK, Lo DY, Wei HW, Kuo HC. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from canine urinary tract infections. *J Vet Med Sci* 2015, 77: 59-65.
- Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual* 2009, 38: 1086-1108.
- Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann HW, Kropinski AM, Boerlin P. Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses* 2012, 4: 471-487.
- Connerton IF, Connerton PL, Barrow P, Seal BS, Atterbury RJ. Bacteriophage Therapy and *Campylobacter*. Teoksessa: *Campylobacter*, Third Edition. American Society of Microbiology, 2008:
- da Silva Duarte V, Dias RS, Kropinski AM, Campanaro S, Treu L, Siqueira C, Vieira MS, da Silva Paes I, Santana GR, Martins F, Crispim JS, da Silva Xavier A, Ferro CG, Vidigal PMP, da Silva CC, de Paula SO. Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB_EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. *Sci Rep* 2018, 8: 6845-018-24896-w.
- Dąbrowska K. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med Res Rev* 2019, 39: 2000-2025.
- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 2008, 190: 1390-1400.
- Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics (Basel)* 2018, 7: 66. doi: 10.3390/antibiotics7030066.
- Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci* 2012, 13: 699-722.
- Dufour N, Delattre R, Ricard JD, Debarbieux L. The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams. *Clin Infect Dis* 2017, 64: 1582-1588.
- EFSA. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal* 2020;18(3):6007, 166 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>. EFSA Journal 2020,
- European Medicines Agency 2017. Zinc oxide. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/referrals/zinc-oxide>, haettu 7.5.2020.
- Evira 2015. Ajankohtaista MRSA-bakteerista sikatiloilla. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/viljelijat/elaintenpito/elainten-laakitseminen/mrsa-ohje_sikatiloille_20150121_su.pdf, haettu 6.5.2020.

Evira 2016. Mikrobilääkkeiden käyttösuositukset eläinten tärkeimpiin tulehdus- ja tartuntatauteihin. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/viljelijat/elainten-pito/elainten-laakitseminen/mikrobilääkkeiden_kayttosuositukset_fi_2.pdf, haettu 6/2020.

Evira 2018. FINRES-Vet 2016–2017. Finnish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring and Consumption of Antimicrobial Agents. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/viljelijat/elaintenpito/elainten-laakitseminen/evira_publications_5_2018.pdf, haettu 6.5.2020.

Fan J, Zeng Z, Mai K, Yang Y, Feng J, Bai Y, Sun B, Xie Q, Tong Y, Ma J. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. *Vet Microbiol* 2016, 191: 65-71.

FAO/WHO. Salmonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 19. Rome. 56 pp. 2009,

Fernández L, Gutiérrez D, Rodríguez A, García P. Application of Bacteriophages in the Agro-Food Sector: A Long Way Toward Approval. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 8: 296.

Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W, Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* 2005, 34: 258-263.

Food and Agriculture Organization 2016. Antimicrobial resistance and our food systems: challenges and solutions. <http://www.fao.org/3/a-i6106e.pdf>, haettu 7.5.2020.

Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J Fish Dis* 2011, 34: 643-661.

Freitag T, Squires RA, Schmid J. Naturally occurring bacteriophages lyse a large proportion of canine and feline uropathogenic *Escherichia coli* isolates in vitro. *Res Vet Sci* 2008, 85: 1-7.

Frola ID, Pellegrino MS, Espeche MC, Giraudo JA, Nader-Macias ME, Bogni CI. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J Dairy Res* 2012, 79: 84-92.

Gelman D, Eisenkraft A, Chanishvili N, Nachman D, Copenhagen Glazer S, Hazan R. The history and promising future of phage therapy in the military service. *J Trauma Acute Care Surg* 2018, 85: S18-S26.

Gharaibeh MH, Shatnawi SQ. An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. *Vet World* 2019, 12: 1735-1746.

Gigante A, Atterbury RJ. Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. *Virology* 2019, 16: 155-019-1260-3.

Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50: 2912-2918.

- Gómez E, Méndez J, Cascales D, Guijarro JA. *Flavobacterium psychrophilum* vaccine development: a difficult task. *Microb Biotechnol* 2014, 7: 414-423.
- Green SI, Kaelber JT, Ma L, Trautner BW, Ramig RF, Maresso AW. Bacteriophages from ExPEC Reservoirs Kill Pandemic Multidrug-Resistant Strains of Clonal Group ST131 in Animal Models of Bacteremia. *Sci Rep* 2017, 7: 46151.
- Grøntvedt CA, Elstrøm P, Stegger M, Skov RL, Skytt Andersen P, Larssen KW, Urdahl AM, Angen Ø, Larsen J, Åmdal S, Løtvedt SM, Sunde M, Bjørnholt JV. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Humans and Pigs in Norway: A "One Health" Perspective on Introduction and Transmission. *Clin Infect Dis* 2016, 63: 1431-1438.
- Gutiérrez D, Fernández L, Rodríguez A, García P. Role of Bacteriophages in the Implementation of a Sustainable Dairy Chain. *Front Microbiol* 2019, 10: 12.
- Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature* 2020, 577: 327-336.
- Hansen VM, Rosenquist H, Baggesen DL, Brown S, Christensen BB. Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter* Penner serotypes. *BMC Microbiol* 2007, 7: 90-2180-7-90.
- Hawkins C, Harper D, Burch D, Anggard E, Soothill J. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Vet Microbiol* 2010, 146: 309-313.
- Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S. The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Frontiers in Microbiology* 2019, 10: 1674.
- Higuera G, Bastías R, Tsertsvadze G, Romero J, Espejo RT. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 2013. 392-395 128-33.
- Hobbs Z, Abedon ST. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS Microbiol Lett* 2016, 363: fnw047.
- Honegger J, Lehnerr H, Bachofen C, Stephan R, Sidler X. Field trial for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pig breeding farm by bacteriophages. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2020, 162: 307-317.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010, 327: 167-170.
- Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers¹. *Poultry Science* 2004. 83(12): 1944-7.
- Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals (Basel)* 2019, 12: 35. doi: 10.3390/ph12010035.

- Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 2010, 70: 217-248.
- Imbeault S, Parent S, Lagacé M, Uhland CF, Blais J. Using Bacteriophages to Prevent Furunculosis Caused by *Aeromonas salmonicida* in Farmed Brook Trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 2006, 18: 203-214.
- Jamalludeen N, Johnson RP, Shewen PE, Gyles CL. Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs. *Vet Microbiol* 2009, 136: 135-141.
- Jończyk-Matysiak E, Weber-Dąbrowska B, Owczarek B, Międzybrodzki R, Łusiak-Szelachowska M, Łodej N, Górski A. Phage-Phagocyte Interactions and Their Implications for Phage Application as Therapeutics. *Viruses* 2017, 9: 150. doi: 10.3390/v9060150.
- Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents* 2019, 53: 16-21.
- Kim J, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, Park SC. Biological Control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using *Aeromonas* Phage PAS-1. *Transbound Emerg Dis* 2015, 62: 81-86.
- Kim J, Hosseindoust A, Lee SH, Choi YH, Kim MJ, Lee JH, Kwon IK, Chae BJ. Bacteriophage cocktail and multi-strain probiotics in the feed for weanling pigs: effects on intestine morphology and targeted intestinal coliforms and *Clostridium*. *Animal* 2017, 11: 45-53.
- Kittler S, Fischer S, Abdulmawjood A, Gländer G, Klein G. Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 2013, 79: 7525-7533.
- Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* 2019, 25: 219-232.
- Krut O, Bekeredjian-Ding I. Contribution of the Immune Response to Phage Therapy. *J Immunol* 2018, 200: 3037-3044.
- Krylov V, Shaburova O, Pleteneva E, Krylov S, Kaplan A, Burkaltseva M, Polygach O, Chesnokova E. Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Viol Sin* 2015, 30: 33-44.
- Kuhn JC. Detection of *Salmonella* by bacteriophage Felix 01. *Methods Mol Biol* 2007, 394: 21-37.
- Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol* 2010, 28: 591-595.
- Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol* 2010, 11: 69-86.
- Laanto E, Bamford JK, Ravantti JJ, Sundberg LR. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture. *Front Microbiol* 2015, 6: 829.

Larsen J, Petersen A, Sørnum M, Stegger M, van Alphen L, Valentiner-Branth P, Knudsen LK, Larsen LS, Feingold B, Price LB, Andersen PS, Larsen AR, Skov RL. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. *Euro Surveill* 2015, 20: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.37.30021. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.37.30021.

Le Devendec L, Jouy E, Paboeuf F, de Boissacqson C, Lucas P, Drider D, Kempf I. Development of a pig infection model with colistin-resistant *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2018, 226: 81-88.

Lee S, Kim MG, Lee HS, Heo S, Kwon M, Kim G. Isolation and Characterization of *Listeria* phages for Control of Growth of *Listeria monocytogenes* in Milk. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2017, 37: 320-328.

Leitner L, Sybesma W, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkhotua A, Ujmajuridze A, Schneider MP, Sartori A, Mehnert U, Bachmann LM, Kessler TM. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC Urol* 2017, 17: 90-017-0283-6.

Lhermie G, Tauer LW, Gröhn YT. The farm cost of decreasing antimicrobial use in dairy production. *PLoS One* 2018, 13: e0194832.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016, 16: 161-168.

Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011, 1: 111-114.

Loch TP, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J Adv Res* 2015, 6: 283-300.

Machado VS, Bicalho ML, Pereira RV, Caixeta LS, Bittar JH, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. The effect of intrauterine administration of mannose or bacteriophage on uterine health and fertility of dairy cows with special focus on *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes*. *J Dairy Sci* 2012, 95: 3100-3109.

Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladisavljevic GT, Clokie MRJ, Garton NJ, Stapley AGF, Kirpichnikova A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci* 2017, 249: 100-133.

Marza JA, Soothill JS, Boydell P, Collyns TA. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* 2006, 32: 644-646.

Mattila S, Ruotsalainen P, Jalasvuori M. On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. *Front Microbiol* 2015, 6: 1271.

McCrea BA, Tonooka KH, VanWorth C, Boggs CL, Atwill ER, Schrader JS. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry. *Poult Sci* 2006, 85: 136-143.

- Meira EBS, Rossi RS, Teixeira AG, Kaçar C, Oikonomou G, Gregory L, Bicalho RC. The effect of prepartum intravaginal bacteriophage administration on the incidence of retained placenta and metritis. *Journal of Dairy Science* 2013. 96(12): 7658-65.
- Mirzaei MK, Maurice CF. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat Rev Microbiol* 2017, 15: 397-408.
- Moelling K, Broecker F, Willy C. A Wake-Up Call: We Need Phage Therapy Now. *Viruses* 2018, 10: 688. doi: 10.3390/v10120688.
- Mörk M, Lindberg A, Alenius S, Vågsholm I, Egenvall A. Comparison between dairy cow disease incidence in data registered by farmers and in data from a disease-recording system based on veterinary reporting. *Prev Vet Med* 2009, 88: 298-307.
- Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses* 2018, 10: 205. doi: 10.3390/v10040205.
- Nabil NM, Tawakol MM, Hassan HM. Assessing the impact of bacteriophages in the treatment of Salmonella in broiler chickens. *Infect Ecol Epidemiol* 2018, 8: 1539056.
- Nabuurs MJ, Hoogendoorn A, van der Molen EJ, van Osta AL. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in The Netherlands. *Res Vet Sci* 1993, 55: 78-84.
- Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics (Basel)* 2020, 9: 135. doi: 10.3390/antibiotics9030135.
- Nobrega FL, Costa AR, Santos JF, Siliakus MF, van Lent, Jan W. M., Kengen SWM, Azeredo J, Kluskens LD. Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine. *Scientific Reports* 2016, 6: 39235.
- O'Flaherty S, Coffey A, Meaney WJ, Fitzgerald GF, Ross RP. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett Appl Microbiol* 2005, 41: 274-279.
- Ortega C, Gimeno O, Blanc V, Cortés M, S A, M L. Antibiotic susceptibility of strains of *Aeromonas salmonicida* isolated from spanish salmonids. *Revue de médecine vétérinaire* 2006, 157: 1-5.
- Parasion S, Kwiatek M, Gryko R, Mizak L, Malm A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Pol J Microbiol* 2014, 63: 137-145.
- Patey O, McCallin S, Mazure H, Liddle M, Smithyman A, Dublanchet A. Clinical Indications and Compassionate Use of Phage Therapy: Personal Experience and Literature Review with a Focus on Osteoarticular Infections. *Viruses* 2018, 11: 18. doi: 10.3390/v11010018.
- Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *J Antimicrob Chemother* 2016, 71: 2071-2074.
- Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, 100: 2141-2151.

Pirnay J, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vanechoutte M, Zizi M, Laire G, Lavigne R, Huys I, Van den Mooter G, Buckling A, Debarbieux L, Pouillot F, Azeredo J, Kutter E, Dublanchet A, Górski A, Adamia R. The Phage Therapy Paradigm: Prêt-à-Porter or Sur-mesure? *Pharm Res* 2011, 28: 934-937.

Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, Mateus A, Moreno MA, Pyörälä S, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Kunsagi Z, Torren-Edo J, Jukes H, Törneke K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother* 2017, 72: 957-968.

Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56: 3568-3575.

Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front Pharmacol* 2019, 10: 513.

Pulkkinen K, Suomalainen LR, Read AF, Ebert D, Rintamäki P, Valtonen ET. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proc Biol Sci* 2010, 277: 593-600.

Pyörälä S, Tiihonen T. *Nautojen sairaudet* 2005. 2005.

Quinones M, Kimsey HH, Waldor MK. LexA cleavage is required for CTX prophage induction. *Mol Cell* 2005, 17: 291-300.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 2015. 117 119-28.

Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol* 2016, 7: 1789.

Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand* 2017, 59: 31-017-0299-7.

Ringo E, Jutfelt F, Kanapathipillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res* 2004, 318: 305-311.

Rorbo N, Ronneth A, Kalatzis PG, Rasmussen BB, Engell-Sorensen K, Kleppen HP, Wergeland HI, Gram L, Middelboe M. Exploring the Effect of Phage Therapy in Preventing *Vibrio anguillarum* Infections in Cod and Turbot Larvae. *Antibiotics (Basel)* 2018, 7: 10.3390/antibiotics7020042.

Rowan A, Kartal T. Dog Population & Dog Sheltering Trends in the United States of America. *Animals (Basel)* 2018, 8: 68. doi: 10.3390/ani8050068.

Rozema EA, Stephens TP, Bach SJ, Okine EK, Johnson RP, Stanford K, McAllister TA. Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* 2009, 72: 241-250.

- Ruokavirasto 2019a. Antibioottiresistenssi lihan tuotannossa.
https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/yhteisot/riskinarviointi/liitteet/info_antibioottiresistenssi_lihan_tuotanto_fi.pdf, haettu 6/2020.
- Ruokavirasto 2019b. FINRES-Vet 2018. Finnish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring and Consumption of Antimicrobial Agents. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/julkaisut/julkaisusarjat/julkaisuja/elaimet/finres-vet_2018_141119.pdf, haettu 6/2020.
- Ruokavirasto 2019c. Kamylobakterioosi.
 ruokavirasto.fi/teemat/zoonoosikeskus/zoonoosit/bakteerien-aiheuttamat-taudit/kamylobakterioosi/, haettu 7.5.2020.
- Ruokavirasto 2020. Tuotantoeläimille hyväksytyt lääkevalmisteet.
https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/viljelijat/elaintenpito/elainten-laakitseminen/hallittu_laakekekaytto/laakeluettelot/tuotantoelaimet_valm2.pdf, haettu 5.6.2020.
- Ryan E, Garland MJ, Singh TR, Bambury E, O'Dea J, Migalska K, Gorman SP, McCarthy HO, Gilmore BF, Donnelly RF. Microneedle-mediated transdermal bacteriophage delivery. *Eur J Pharm Sci* 2012, 47: 297-304.
- Sails AD, Wareing DR, Bolton FJ, Fox AJ, Curry A. Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages. *J Med Microbiol* 1998, 47: 123-128.
- Santos TMA, Gilbert RO, Caixeta LS, Machado VS, Teixeira LM, Bicalho RC. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *Journal of Dairy Science* 2010. 93(1): 105-14.
- Schmelcher M, Powell AM, Becker SC, Camp MJ, Donovan DM. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78: 2297-2305.
- Schmelcher M, Powell AM, Camp MJ, Pohl CS, Donovan DM. Synergistic streptococcal phage lambdaSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, 99: 8475-8486.
- Schmidt C. Phage therapy's latest makeover. *Nat Biotechnol* 2019, 37: 581-586.
- Scott Weese J. Antimicrobial resistance in companion animals. *Anim Health Res Rev* 2008, 9: 169-176.
- Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K, Connerton IF. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Pathog* 2007, 3: e119.
- Sheldon IM, Rycroft AN, Zhou C. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet Rec* 2004, 154: 289-293.
- Shende RK, Hirpurkar SD, Sannat C, Rawat N, Pandey V. Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Vet World* 2017, 10: 973-978.

- Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett* 2007, 29: 995-1003.
- Skurnik M, Kiljunen S. Possibilities of bacteriophage therapy. *Duodecim* 2016, 132: 712-719.
- Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol* 2006, 296: 5-14.
- Sørensen AIV, Jensen VF, Boklund A, Halasa T, Christensen H, Toft N. Risk factors for the occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) in Danish pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2018. 159 22-9.
- Stanford K, McAllister TA, Niu YD, Stephens TP, Mazzocco A, Waddell TE, Johnson RP. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* 2010, 73: 1304-1312.
- Stenholm AR, Dalsgaard I, Middelboe M. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 4070-4078.
- Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 2001, 55: 437-451.
- Suomalainen LR, Kunttu H, Valtonen ET, Hirvela-Koski V, Tiirola M. Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland. *Dis Aquat Organ* 2006, 70: 55-61.
- Suomalainen LR, Tiirola MA, Valtonen ET. Effect of *Pseudomonas* sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. *Dis Aquat Organ* 2005, 63: 61-68.
- Tagliaferri TL, Jansen M, Horz HP. Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Front Cell Infect Microbiol* 2019, 9: 22.
- Teichmann-Knorrn S, Reese S, Wolf G, Hartmann K, Dorsch R. Prevalence of feline urinary tract pathogens and antimicrobial resistance over five years. *Vet Rec* 2018, 183: 21.
- THL 2020. MRSA esiintyvyys Suomessa. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/mrsa/mrsa-esiintyvyys-suomessa>, haettu 6.5.2020.
- Titze I, Krömker V. Antimicrobial Activity of a Phage Mixture and a Lactic Acid Bacterium against *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. *Vet Sci* 2020, 7: 31. doi: 10.3390/vetsci7010031.
- Torres-Barcelo C, Gurney J, Gougat-Barbera C, Vasse M, Hochberg ME. Transient negative effects of antibiotics on phages do not jeopardise the advantages of combination therapies. *FEMS Microbiol Ecol* 2018, 94: 10.1093/femsec/fiy107.
- Tramuta C, Nucera D, Robino P, Salvarani S, Nebbia P. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *J Vet Sci* 2011, 12: 49-55.
- Ushanov L, Lasareishvili B, Janashia I, Zautner AE. Application of *Campylobacter jejuni* Phages: Challenges and Perspectives. *Animals (Basel)* 2020, 10: 279. doi: 10.3390/ani10020279.

- Verbeken G, Pirnay JP, Lavigne R, Jennes S, De Vos D, Casteels M, Huys I. Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014, 62: 117-129.
- Verner–Jeffreys DW, Algoet M, Pond MJ, Virdee HK, Bagwell NJ, Roberts EG. Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not readily controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture* 2007. 270(1): 475-84.
- Verstappen KM, Tulinski P, Duim B, Fluit AC, Carney J, van Nes A, Wagenaar JA. The Effectiveness of Bacteriophages against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Nasal Colonization in Pigs. *PLoS One* 2016, 11: e0160242.
- Verthe K, Possemiers S, Boon N, Vaneechoutte M, Verstraete W. Stability and activity of an *Enterobacter aerogenes*-specific bacteriophage under simulated gastro-intestinal conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 65: 465-472.
- Verthé K, Possemiers S, Boon N, Vaneechoutte M, Verstraete W. Stability and activity of an *Enterobacter aerogenes*-specific bacteriophage under simulated gastro-intestinal conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 65: 465-472.
- Waddell T, Mazzocco A, Pacan J, Ahmed R, Johnson R, Poppe C, Khakhria R, keksijät; Use of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157. U.S. patent US6485902B2.
- Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol* 2005, 109: 275-283.
- Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M, Górski A. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Frontiers in Microbiology* 2016, 7: 1177.
- Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2004, 28: 127-181.
- WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. 2015.
- Yap ML, Klose T, Arisaka F, Speir JA, Veisler D, Fokine A, Rossmann MG. Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113: 2654-2659.
- Zhang J, Laakso J, Mappes J, Laanto E, Ketola T, Bamford JK, Kunttu H, Sundberg LR. Association of colony morphotypes with virulence, growth and resistance against protozoan predation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *FEMS Microbiol Ecol* 2014, 89: 553-562.